

Heinz O. Faulstich

SYNTHESEN PHALLOINÄHNLICHER PEPTIDE

Frankfurt am Main 1965

1964



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546412_0077

SYNTHESEN PHALLOINÄHNLICHER PEPTIDE

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der naturwissenschaftlichen Fakultät
der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität
zu Frankfurt am Main

vorgelegt von Heinz O. Faulstich

Frankfurt am Main

1964

Gedruckt mit Genehmigung
der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main



1. Gutachter: Prof.Dr.Wieland

2. Gutachter: Prof.Dr.Teuber

Tag der mündlichen Prüfung: 16.7.1964

Tag der Promotion: 27.7.1964

MEINER MUTTER

IN DANKBARKEIT GEWIDMET

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung
von Herrn Professor Dr. THEODOR WIELAND
in der Zeit von Oktober 1961 bis März 1964
im Institut für Organische Chemie an der
Johann-Wolfgang-Goethe-Universität in
Frankfurt am Main durchgeführt.

Meinem hochverehrten Lehrer
Herrn Professor Dr. THEODOR WIELAND
danke ich herzlich für die Überlassung
des Themas dieser Arbeit, für wertvolle
Ratschläge und für seine großzügige Förderung.

Inhaltsübersicht

A.	<u>Einleitung</u>	1
B.	<u>Synthese der schwefelverbrückten Modelle</u>	6
	1. Versuch einer Darstellung aus einem Cbo- geschützten Heptapeptid	
	2. Aufbau des BOC-geschützten Heptapeptids	8
	3. Darstellung der Bicyclen	11
	4. Syntheschema	16
	5. Zusammenfassung und Deutung	18
C.	<u>Synthese des ⁴L-Hypro-⁷D,L-Hyleu-Secophalloins</u>	20
	1. γ -Hydroxyleucin	
	2. Synthese des Tetrapeptids	26
	3. Synthese des cysteinhaltigen Tripeptids	30
	4. Synthese und Isolierung des Thioäthers	33
	5. Cyclisierung	39
	6. Syntheschema	41
	7. Identifizierung des synthetischen ⁴ L-Hy- pro- ⁷ D,L-Hyleu-Secophalloins	44
	8. Versuche zur Bicyclisierung	50
	9. Zusammenfassung und Deutung	54
D.	<u>Experimenteller Teil</u>	55
E.	<u>Literaturverzeichnis</u>	96

A. Einleitung

Eine der kristallisierten Giftkomponenten des grünen Knollenblätterpilzes (*Amanita phalloides*) ist das Phalloin (1), ein bicyclisches Heptapeptid, das sich aus folgenden Aminosäuren zusammensetzt:

L-allo-Hydroxyprolin

L-Tryptophan

L- β -Hydroxyleucin

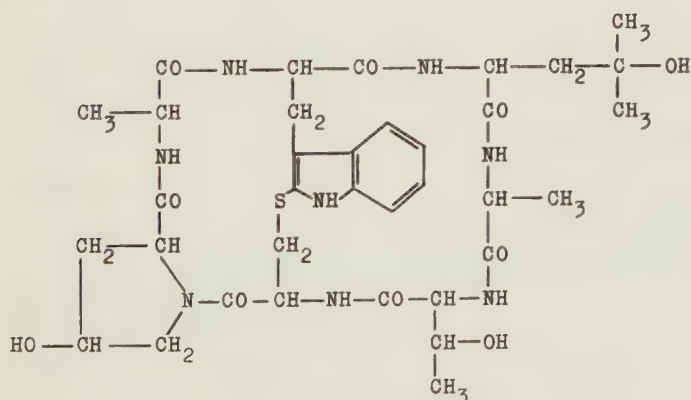
L-Alanin

D-Threonin

L-Cystein und nochmals

L-Alanin.

Nach einer kürzlich vorgenommenen Korrektur (2) kommt dem Gift folgende Struktur zu ⁺):



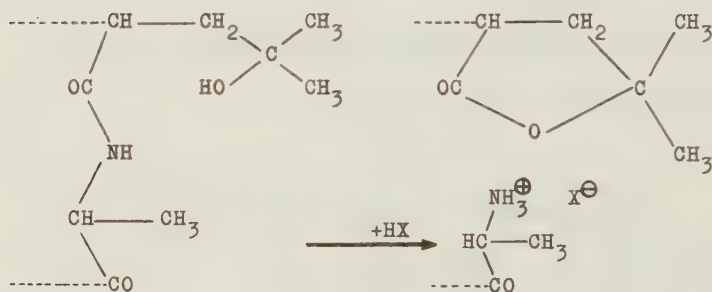
⁺) Diese neue Formel war zu Beginn der Arbeit noch nicht bekannt.

Die Toxizität des Phalloins beträgt:

$LD_{50} = 1,4 \text{ mg/kg}$ weiße Maus. (1)

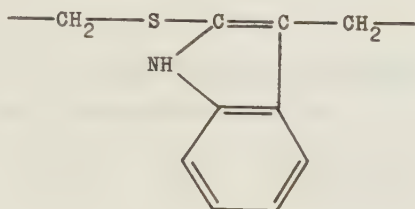
Behandelt man Phalloin mit verdünnter Säure, so öffnet sich der größere, 18-gliedrige Ring zwischen dem L- γ -Hydroxyleucin und dem L-Alanin, wobei sich ein sehr stabiles γ -Lacton bildet. (Mechanismus S. 23).

Das entstehende Partialhydrolysat wird Secophalloin genannt und ist ungiftig (3):

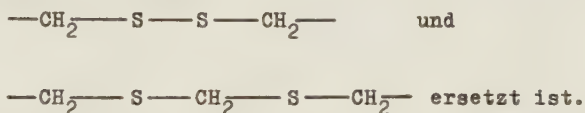


Die vorliegende Arbeit hatte 2 Ziele:

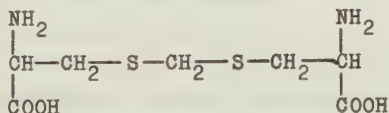
1. Es sollte ein Modell synthetisiert werden, bei dem die Thioätherbrücke am Indol



durch einfache schwefelhaltige Brücken, wie z.B.:

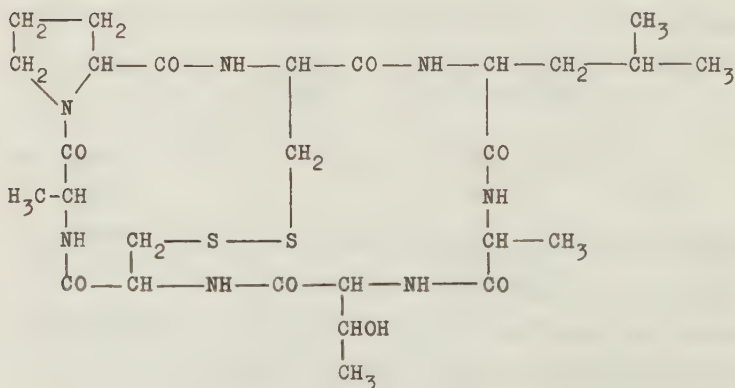


Ebenso sollten die seltenen Aminosäuren L-allo-Hydroxyprolin und L- β -Hydroxy-leucin durch L-Prolin und L-Leucin ersetzt werden. Aus Unkenntnis der wahren Struktur des Phalloins sind im Vergleich zum Naturstoff zudem L-Alanin und L-Prolin vertauscht. Chemisch gesehen handelt es sich dabei um bicyclische Peptidderivate des Cystins und der Djenkolsäure (4,5):



Falls diese Modelle toxisch wären, würden sie die Hypothese stützen, daß die eigenartige starre Körbchenstruktur der Phalloinmolekel eng mit ihrer Toxizität verknüpft ist.

Das zunächst angestrebte cystinhaltige Modell Bicyclo-(L-alanyl-D-threonyl-L-alanyl(β -yl)-L-alanyl-L-prolyl-L-alanyl(β -yl)-L-leucyl)-disulfid ⁺) hatte somit folgende Struktur:



Daraus sollte sich das djenkolsäurehaltige Modell herstellen lassen.

⁺) zur Nomenklatur s. Fußnote nächste Seite

2. Es soll

Cyclo-(L-alanyl-D-threonyl-L-alanyl(β -yl)-L-hydroxy-
prolyl-L-alanyl-L-tryptophyl(ind-2-yl)-D,L-hydroxy-leucin-
lacton)-sulfid bzw.

⁴L-Hypro-⁷D,L-Hyleu-Secophalloin ⁺)

dargestellt und die Cyclisierung zum entsprechenden
Phalloinmodell versucht werden.

⁺) Zur N o m e n k l a t u r: Die hier verwendete Nomen-
klatur behält das dem Namen der Aminosäure angehängte
- yl der Peptidbindung vor, und kennzeichnet weitere
Substitutionen im Molekül einer Aminosäure nach nähe-
rer Kennzeichnung der Substitutionsstelle (also z.B.
(ind-2) oder (β) mit einem nachgesetzten - yl.
Die Zählung der Aminosäuren in Secophalloinderivaten
erschien zweckmäßig. Gezählt wurde vom Aminoende her,
d.h. das durch die Partialhydrolyse freie L-Alanin =
¹L-Alanin.

B. Synthese der schwefelverbrückten Modelle

1. Versuch einer Darstellung aus einem Cbo-geschützten Heptapeptid.

Das vom Autor (6) synthetisierte Heptapeptid Cbo-(S-benzyl)-L-cysteinyl-L-alanyl-L-prolyl-(S-benzyl)-L-cysteinyl-L-leucyl-L-alanyl-D-threoninmethylester wurde zunächst mit 1n NaOH in Dioxan verseift. Nach Abziehen des Dioxans im Vakuum entstand trotz der 3 lipophilen Schutzreste eine wäßrige Lösung des Cbo-Heptapeptid-Na-Salzes als klare, opaleszierende Flüssigkeit. Die nach dem Ansäuern mit 1n HCl ausgefallene Cbo-Heptapeptidsäure bildete ein weißes amorphes Pulver.

Die Entfernung des Cbo-Restes durch katalytische Hydrierung war nicht möglich, da das Molekül Schwefel enthielt. Es blieb nur die Abspaltung mit HBr/Eisessig (7). Das Pherogramm bei pH 6,5 zeigte nach der Abspaltung 3 etwa gleichstarke Banden, so daß Proteolyse von Peptidbindungen eingetreten sein mußte. Daraufhin deuten auch früher gemachte Beobachtungen (6), wo bei der Entcarbobenzylierung von schwefelhaltigen Peptiden mit Bromwasserstoff Bruchstücke auftraten, und die Ausbeute an braunem, öligem Produkt oft 30% nicht überstieg.

Ein Versuch, den Cbo-Rest mit konz. HCl (15 Min. bei 40°C) zu entfernen, zeigte bei der pherographischen Untersuchung die gleichen Zersetzungsprodukte. Eine chromatographische oder elektrophoretische Aufarbeitung der Produkte schien nicht vorteilhaft, da fast $\frac{2}{3}$ der Substanz zerstört wurden, und der analoge Aufbau eines BOC-geschützten Heptapeptids keine grossen Schwierigkeiten bieten konnte.

2. Der Aufbau des BOC-geschützten Heptapeptids

Analog dem Aufbau des Cbo-Heptapeptids sollte die Synthese von BOC-(S-benzyl)-L-cysteinyl-L-alanyl-L-prolyl-(S-benzyl)-L-cysteinyl-L-leucyl-L-alanyl-D-threoninmethylester aus einem Tri- und einem Heptapeptid erfolgen:

- L-Leucyl-L-alanyl-D-threoninmethylester-trifluoracetat
- BOC-(S-benzyl)-L-cysteinyl-L-alanyl-L-prolyl-(S-benzyl)-L-cystein

a. Tripeptid. Dieses Bruchstück wurde bereits zur Synthese des Cbo-geschützten Heptapeptids verwendet und ist dort beschrieben worden (6).

b. Tetrapeptid. Das Tetrapeptid wurde konsequent mit Hilfe der t-BOC-Schutzgruppe (8,9) aufgebaut, um die Abspaltung des Cbo-Restes mit HBr/Eisessig zu vermeiden. Zur Knüpfung der Peptidbindung wurde fast ausschließlich die Methode der gemischten Anhydride (10,11,12) verwandt.

BOC-L-alanin wurde analog einer Vorschrift zur Darstellung von BOC-leucin hergestellt. Es fällt zunächst ölig an, kristallisiert aber beim Stehen an der Luft. Nur diese roh gewonnenen Kristalle, nicht aber das Öl, lassen sich aus Äther/Petroläther umkristallisieren. Beim schar-

fen Trocknen erhöht sich der Schmelzpunkt der Kristalle von 61°C auf 82°C . Offensichtlich enthält also BOC-alanin Kristallwasser (wie auch BOC-leucin, das bei scharfem Trocknen ein Öl ergibt).

Nach der Methode der gemischten Anhydride wurde daraus der BOC-L-alaninthiophenylester als kristalline Substanz gewonnen und mit L-Prolin-Na zu BOC-L-alanyl-L-prolin (I) umgesetzt. Der Umweg über den Thiophenylester war notwendig, da sich beim direkten Umsatz des gemischten Anhydride mit Prolin das Dipeptid nur in schlechter Ausbeute bildet.

(S-Benzyl)-L-cysteinmethylester-hydrochlorid (13,14) ist leicht aus (S-Benzyl)-L-cystein (16) durch Veresterung mit SOCl_2 (15) zugänglich.

Da das prolinendständige Peptid ohne Racemisierungsgefahr als gemischtes Anhydrid aktiviert werden kann, wurde nach dieser Methode BOC-L-alanyl-L-prolyl-(S-benzyl)-L-cysteinmethylester (II) hergestellt und der t-BOC-Rest mit Trifluoressigsäure abgespalten. (III).

Reines BOC-(S-benzyl)-L-cystein ist durch direkte Einführung des Schutzrestes in (S-Benzyl)-L-cystein zwar kristallin, aber nur mit braunen Schmierern behaftet zu-

gänglich. Daher wurde der vorrätige, relativ saubere BOC-(S-benzyl)-L-cysteinmethylester (6) in 1n Natronlauge verseift. Das entstehende BOC-(S-benzyl)-L-cystein enthält aller Wahrscheinlichkeit nach ebenfalls Kristallwasser (wie BOC-L-alanin und BOC-L-leucin). Nach scharfem Trocknen steigt der Schmelzpunkt von 42°C auf 107°C an.

Das so gewonnene Cysteinderivat wurde - wieder nach der Methode der gemischten Anhydride - mit dem freigesetzten Tripeptid verbunden. Das Tetrapeptid BOC-(S-benzyl)-L-cysteiny-L-alanyl-L-prolyl-(S-benzyl)-L-cysteinmethylester (IV) kristallisiert in langen weißen Nadeln. Ein Versuch, die Verknüpfung zum Tetrapeptid mit Dicyclohexylcarbodiimid (17,18) vorzunehmen, führte vom Tripeptid-trifluoracetat (III) zum Trifluoracetyl-tripeptid, was nach kurzem Behandeln mit NaOH pherographisch nachgewiesen werden konnte.

Die Verseifung des Tetrapeptids wurde wieder in Dioxan mit 1n NaOH durchgeführt. (V). Es war nicht bekannt, daß unter diesen Umständen Racemisierung eintreten kann (19).

c. Heptapeptid: Die beiden Bruchstücke wurden - wieder mit Hilfe des gemischten Anhydrids - zusammengebaut. Auch hierbei besteht die Gefahr der Racemisierung am aktivierten Cystein (20,21). Das beiderseits geschützte Heptapeptid (VI) ist ein amorphes, leicht gelbliches Pulver.

3. Darstellung der Bicyclen

a. Das freie Heptapeptid: Das durch den t-BOC-Rest und die Methylestergruppe geschützte Heptapeptid (VI) wurde mit 1n NaOH in Dioxan verseift (VII). Nach der Entfernung des t-BOC-Restes mit Trifluoressigsäure (22) (VIII) wurde zur Reinigung von geringen Mengen einer Begleitsubstanz, die im Pherogramm bei pH 1,9 vor dem freien Heptapeptid herlief, 4 $\frac{1}{2}$ Stunden bei pH 1,9 auf Karton elektropherographiert. Die Substanzen ließen sich im UV-Licht lokalisieren, und wurden mit Methanol eluiert. Da sich in der sauren Pufferlösung aus dem Trifluoracetat das Acetat bzw. das Formiat des freien Peptids gebildet hatte, wurde die Substanz zur Entfernung dieser Anionen in abs. Pyridin gelöst und mit abs. Äther ausgefällt.

b. Die Cyclisierung. Das soisolierte Heptapeptid-Zwitterion (VIII) konnte der Cyclisierung unterworfen werden. Gelöst in dest. Äthanol (1:1000) wurde es mit dem 100-fachen Überschuß an Äthoxyacetylen 12 Stunden bei 50°C am Rückfluß erwärmt (23). Durch Elektrophorese auf Karton bei pH 1,9 wurde noch freies Heptapeptid abgetrennt. Wie Chromatogramme in den Lösungsmittelgemischen "G" und "H" zeigten, war die am Start liegendebliebene Substanz einheitlich. Ihre R_F -Werte waren in beiden Chroma

togrammen größer als die R_F -Werte des offenen Peptids. ($R_F = 0,9$ und $1,0$ gegenüber $R_F = 0,75$). Es dürfte sich also nicht um ein Polymerisat, sondern um ein cyclisches Peptid handeln. Die Ausbeuten an Cyclus (IX) lagen bei 60%.

c. Debenzylierung, Isolierung über Hg-Salz, Disulfidbildung

Zur Abspaltung der Benzylreste am Schwefel wurde der Cyclus (IX) in flüssigem NH_3 gelöst und Na bis zur bleibenden Blaufärbung zugesetzt; der Überschuß an Na mit NH_4Cl zerstört und abgedampft. Der Rückstand zeigte positive Reaktion mit Nitroprussid-Na.

Die Isolierung und Identifizierung des Cyclo-(D-threonyl-L-alanyl-L-leucyl-L-cysteinyl-L-prolyl-L-alanyl-L-cysteinyl) (X) sollte analog der Glutathionsynthese (24) über das Quecksilbersalz erfolgen. So wurde der Rückstand der Debenzylierung in kalter $0,5n H_2SO_4$ gelöst und mit saurer $HgSO_4$ -Lösung versetzt. Es fiel ein weißer seidiger Niederschlag des Hg-Salzes (XI), der abgetrennt, in H_2O suspendiert und mit H_2S zersetzt wurde. Nach Entfernen des HgS und H_2S zeigte die wäßrige Lösung des Cyclus wieder positive Nitroprussid-Na-Reaktion. Sie wurde stark verdünnt und auf pH 6,5 gebracht. Dann wurde Luft durchgeleitet, wobei unter Schäumen eine weiße Substanz ausfiel. Diese Substanz war unlöslich in allen gebräuchlichen Lö-

sungsmitteln, ausgenommen Dimethylformamid. Sie enthielt keine SH-Gruppen mehr, wohl aber -S-S-. In den Chromatogrammen mit den Lösungsmittelgemischen "G" und "H" blieb die Substanz am Start liegen. Es handelt sich also mit Sicherheit um ein polymeres Produkt.

d. Debenzylierung, direkte Oxydation zum Disulfid.

Nachdem die Isolierung über das Hg-Salz nicht den gewünschten Bicyclus geliefert hatte, wurde auf die Reinigung von (X) verzichtet. Das nach der Debenzylierung anfallende Rohprodukt wurde in 1% Essigsäure aufgenommen, mit NH_4OH neutralisiert und 24 Std. mit durchperlender Luft oxydiert. Das entstehende Disulfid fiel nicht aus. Nach dem Abziehen des Wassers wurden die Salze (vorwiegend NH_4 -Acetat und NH_4Cl) weitgehend im Vakuum über H_2SO_4 und KOH entfernt.

Die so isolierte Substanz (XII) ist SH-negativ und -S-S-positiv. Sie ist leicht in Wasser löslich. Ihr R_F -Wert im Lösungsmittelgemisch "G" ist 0,15, in "H" ist $R_F = 0,1$. Das Dünnschichtchromatogramm (KieselgelG/Meth./Wasser/1/1/Chlor) zeigt ebenfalls eine einheitliche Substanz ($R_F = 0,7-0,76$). Elektrophoretisch verhält sich die Verbindung neutral.

Die Aminosäureanalyse ihres Totalhydrolysats nach Stein und Moore (25) lieferte folgende Werte:

(Alanin = 2 gesetzt)

Threonin	1,05
Prolin	1,22
Alanin	2,00
Cystein	1,85
Leucin	1,07

Es handelt sich also mit großer Sicherheit um den gesuchten -S-S-haltigen Bicyclus:

Bicyclo-(L-alanyl-D-threonyl-L-alanyl(β -yl)-L-alanyl-L-prolyl-L-alanyl(β -yl)-L-leucyl)-disulfid (XII).

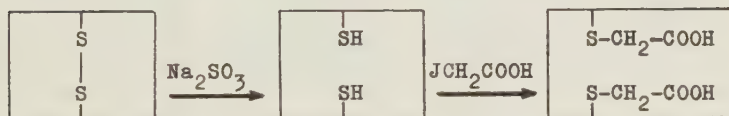
Eine Toxizitätsbestimmung an der weißen Maus zeigte, daß diese Verbindung ungiftig ist.

e. Das bicyclische Djenkolsäurederivat.

Zur Darstellung des Djenkolsäurebicyclus (XIII) wurde das Disulfid (XII) in flüssigem NH_3 (1:1000) gelöst und wieder mit Na bis zur bleibenden Blaufärbung behandelt. Nach dem Entfernen des überschüssigen Na mit NH_4Cl wurde das entstandene Cyclo-bis-Na-mercaptid mit der stöchiometrischen Menge CH_2Cl_2 versetzt und das NH_3 unter Vibrieren abdampfen gelassen. Die zurückbleibende Substanz (XIII) war chromatographisch einheitlich,

elektrophoretisch neutral und ebenfalls leicht wasserlöslich. Bei der Papierchromatographie in "G" und "H", sowie bei der Dünnschichtchromatographie zeigte sie die gleichen R_F -Werte wie das analoge Disulfid.

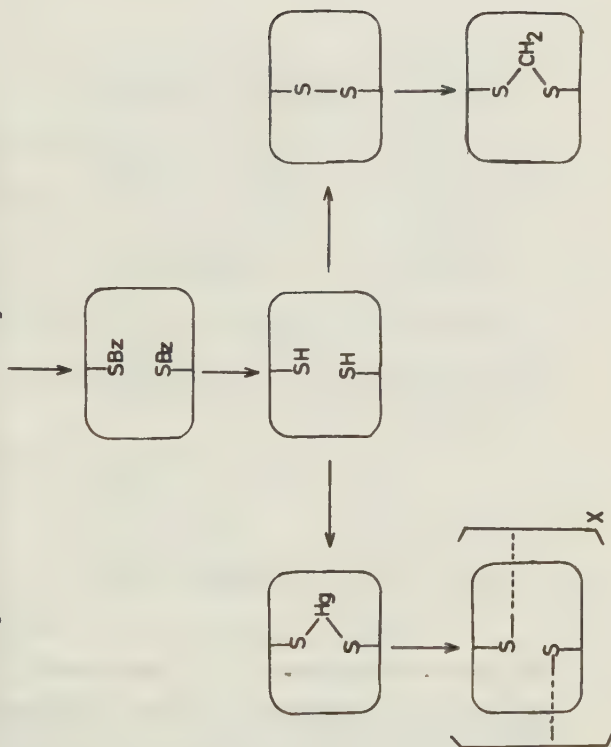
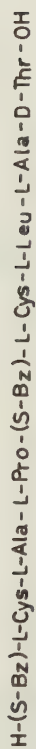
Zur Unterscheidung von eventuell beigemengtem Disulfid wurde (XIII) mit Na_2SO_3 reduziert und mit Jodessigsäure versetzt. Bicyclisches Disulfid liefert unter diesen Bedingungen einen sauren Monocyclus, der in der Elektrophorese bei pH 6,5 zur Anode wandert:



Diese Substanz konnte nicht nachgewiesen werden, so daß es sich bei der vorliegenden Verbindung um reines bicyclisches Djenkolsäurederivat (XIII) handelte.

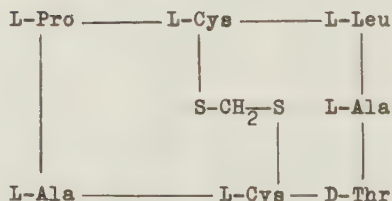
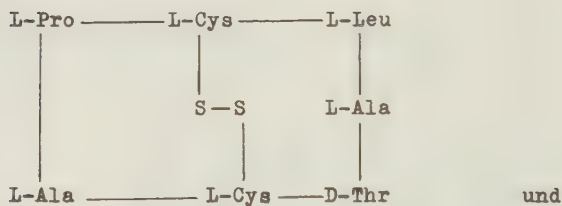
Eine Toxizitätsbestimmung an der weißen Maus zeigte, daß auch diese Verbindung ungiftig ist.

Synthese der Bicyclen:



5. Zusammenfassung und Deutung

Es gelang die Darstellung der beiden schwefelverbrückten Bicyclen:

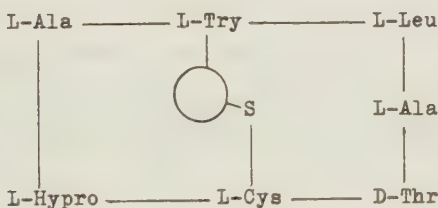


Zur Peptidverknüpfung diente fast ausschließlich die Methode der gemischten Anhydride; zum Schutz der Carboxylgruppe wurde ausschließlich der Methylester verwandt. Zum Schutz der Aminofunktion diente allein der t-BOC-Rest wegen seiner glatten Abspaltbarkeit mit Trifluoressigsäure auch bei schwefelhaltigen Peptiden.

Cyclisiert wurde in 1000-facher Verdünnung mit Äthoxyacetylen in 100-fachem Überschuß.

Beide Bicyclen sind ungiftig.

Diese Tatsache ist verständlich, denn die beiden dargestellten Modellkörper (XII) und (XIII) weisen - mit veränderter Schwefelbrücke, 3 ausgetauschten Aminosäuren und veränderter Sequenz - zu große Abweichungen zum giftigen Naturstoff auf. Selbst ein dem Phalloin so eng verwandtes Analogon wie das Bicyclo-(L-alanyl-D-threonyl-L-alanyl(β -yl)-L-hydroxyprolyl-L-alanyl-L-tryptophyl(ind-2-yl)-L-leucyl)-sulfid



das von R. Sarges (26) der neuen Aminosäuresequenz entsprechend aufgebaut wurde, erwies sich als ungiftig.

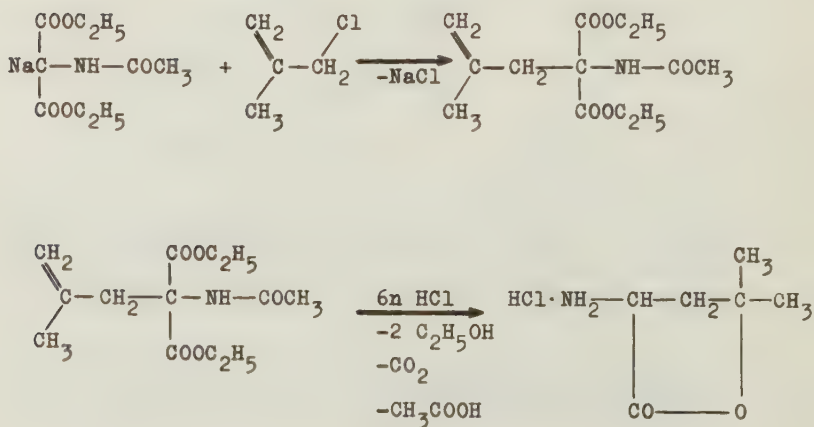
Es besteht die Möglichkeit, daß beide Cysteinmolekeln im Verlauf der Synthese zumindest partiell racemisiert wurden.

C. Die Synthese des ⁴L-Hypro-⁷D,L-Hyleu-Secophalloins.

1. γ -Hydroxyleucin. ⁺)

Das zentrale Problem der Synthese des Secophalloins war die Handhabung des Hydroxyleucins. Diese Aminosäure war bereits 1948 dargestellt worden, doch lagen bis heute keine Erfahrungen über das Verhalten lactonisierender Aminosäuren in der Peptidsynthese vor.

a. Synthese. D,L-Hydroxyleucinlacton-hydrochlorid wurde von J. Fillman und N. Albertson (27) durch Kondensation von Methylallylchlorid und Acetaminomalonester und anschließende saure Hydrolyse dargestellt:



⁺) im folgenden Text steht Hydroxyleucin für γ -Hydroxyleucin

Die Racematspaltung gelang C. Mayer (28) durch fraktionierte Kristallisation der Di-p-toluyltartrate des Hydroxyleucinlactons.

b. Schutzgruppen am Hydroxyleucin. Es war nächstliegend, die sehr stabile γ -Lactongruppe selbst auf ihre Schutznatur zu untersuchen. Es zeigte sich, daß freies Hydroxyleucinlacton mit 5% KHCO_3 -Lösung, also unter den Aufarbeitungsbedingungen von Peptiden, aus Essigester leicht und vollständig ausgewaschen wurde. Somit schien das Lacton als Schutzgruppe ungeeignet. Daß Cbo-D,L-hydroxyleucinlacton und erst recht Cbo-L-tryptophyl-D,L-hydroxyleucinlacton unter den gleichen Bedingungen aus Essigester als K-Salze nur sehr schwer auswaschbar sind, wurde erst viel später erkannt. Als Ursachen für dieses abweichende Verhalten kommen der schwächere induktive Effekt der acylierten Aminogruppe auf das Lacton und die stark lipophile Natur der letztgenannten Verbindungen in Betracht.

Ein Versuch zur Darstellung des Methylesters durch Öffnen des Lactonringes mit Methylat in abs. Methanol mißlang. Nach vorsichtigem Ansäuern traten neben 2 weiteren Banden - vermutlich der Methyläther des Hydroxyleucinlactons sowie eine OH-freie Aminosäure - nur Lacton und offene Form des Hydroxyleucins auf. Auf weitere

Versuche zur Darstellung des Methylesters wurde verzichtet, da dieser als aktive Form sich wahrscheinlich wieder als Lacton stabilisiert hätte.

In Analogie zur Partialhydrolyisierbarkeit des Phalloins bot sich die Amidgruppe des Hydroxyleucins als eine Schutzgruppe an, die relativ beständig und leicht zu entfernen war.

Durch Aminolyse des D,L-Hydroxyleucinlacton-hydrochlorids mit NH_3 unter Druck in abs. Methanol war das Säureamid gut zugänglich und konnte durch Umkristallisieren aus Isopropanol/Äther von nicht umgesetztem Lacton befreit werden. Die analoge Umsetzung des freien D,L-Hydroxyleucinlactons ergab neben dem gesuchten Amid auch Oligomere der Aminosäure.

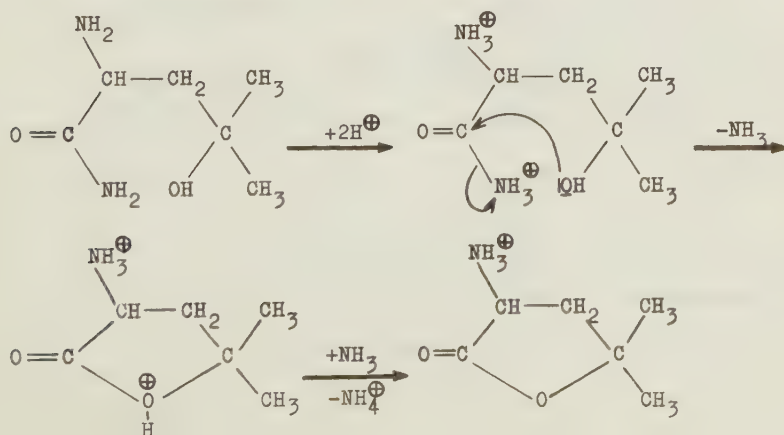
Die Umsetzung des Hydroxyleucinlacton-hydrochlorids in überschüssigem konz. NH_4OH ergab neben Amid auch Ammoniumsalz der Aminosäure, d.h. bei der Sprengung des Ringes tritt neben NH_3 auch OH^- als nukleophiles Agens in Konkurrenz.

Die Umsetzung von Hydroxyleucinlacton-hydrochlorid in flüssigem NH_3 lieferte neben Amid und unumgesetztem Lacton ein weiteres Nebenprodukt (Pherogramm pH 1,9; Ninhydrin) ist also obiger Methode unterlegen.

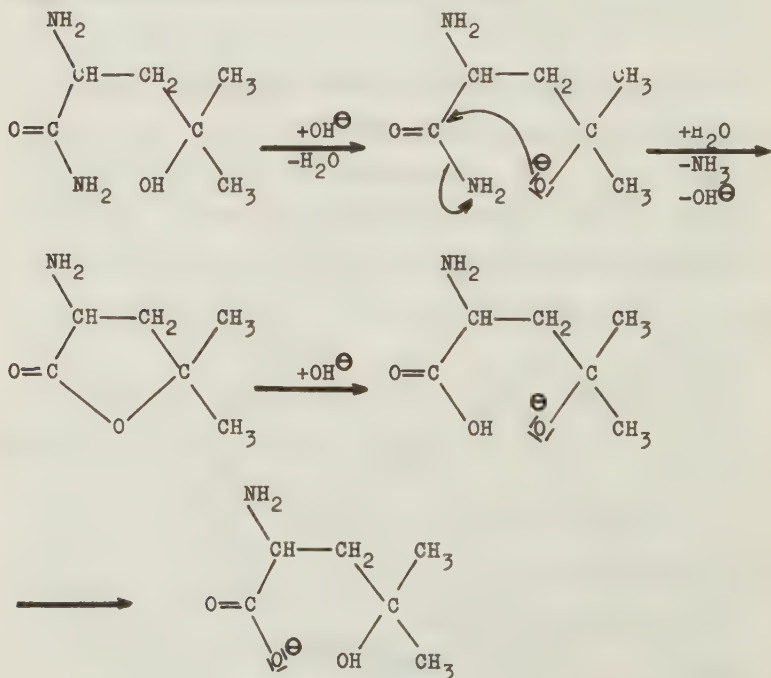
Eine saubere perographische Unterscheidung des Hydroxyleucinamids vom Hydroxyleucinlacton ist nur bei pH 1,9 möglich, da nur im sauren Puffer das Lacton weiter wandert als das Amid.

c. Eigenschaften des Hydroxyleucinamids. Sowohl das Hydrochlorid als auch die freie Base sind außergewöhnlich gut wasserlösliche Substanzen. Dieser stark hydrophile Charakter der Amidgruppe war ein Nachteil bei der Aufbereitung der beiderseits geschützten hydroxyleucinamidhaltigen Peptide in den folgenden Synthesen, da jene wasserlöslich und essigesterunlöslich wurden.(s.S.27,29).

Die Behandlung mit verdünnten Mineralsäuren oder wasserhaltiger Trifluoressigsäure führt durch saure Spaltung des Amids leicht zum stabilen γ -Lacton zurück. Der Mechanismus ist der gleiche wie bei der Bildung des Secophalloins:



Beim Versuch der Reinigung des Hydroxyleucinamids von nicht umgesetztem Hydroxyleucinlacton durch alkalische Öffnung des Lactons zeigte sich, daß die Amidenschutzgruppe auch der alkalischen Hydrolyse unterliegt; ein Gemisch von Amid und Lacton wurde in 1n NaOH gelöst und 36 Std. aufbewahrt. Nach dieser Zeit zeigte das Pherogramm pH 1,9/Ninhydrin nur noch die offene Form des Hydroxyleucins an. Wir besitzen Hinweise, daß diese Reaktion (z.B. bei der Bildung von Secophalloin) bereits unter milderen Bedingungen (z.B. 2n NH_4OH) abläuft. Der Mechanismus dieser alkalischen Hydrolyse des Amids wäre folgendermaßen zu formulieren:



Sowohl die saure als auch die alkalische Spaltung sind infolge der Bildung von NH_4^+ bzw. R-COO^- irreversibel. Die saure Spaltung verläuft schneller.

Diese dargelegten Möglichkeiten der Lactonisierung ließen im Verlauf der Synthese neben den hydroxyleucinamidhaltigen Peptiden immer geringe Mengen von hydroxyleucinlactonhaltigen Peptiden entstehen. (s.S.26,29).

2. Synthese des Tetrapeptids.

a. Tetrapeptidlacton. Ziel war die Synthese des L-Hydroxypropyl-L-alanyl-L-tryptophyl-D,L-hydroxyleucinlacton-trifluoracetats (XIX).

Das D,L-Hydroxyleucinamid-hydrochlorid wurde mit Cbo-L-tryptophan nach der Methode der gemischten Anhydride verknüpft. Das amorphe Reaktionsprodukt (XIV) enthielt geringe Mengen Dipeptidlacton als Verunreinigung, wie sich durch Behandeln des Dipeptidamids mit wasserhaltiger Trifluoressigsäure beweisen ließ. Dicyclohexylcarbodiimid eignet sich nicht zur Synthese, da eine weitere Verunreinigung entsteht, evtl. Dipeptidlactam oder Dipeptidnitril.

Nach der katalytischen Hydrierung wurde das Dipeptid (XV) - wieder nach der Methode der gemischten Anhydride - mit Cbo-L-alanin umgesetzt. Das entstehende Tripeptid Cbo-L-alanyl-L-tryptophyl-D,L-hydroxyleucinamid (XVI) löst sich gut in feuchtem Essigester und kann aus diesem durch Wasserentzug mittels gesättigter NaCl-Lösung oder MgSO_4 siccum nach Animpfen kristallin erhalten werden.

Das katalytisch hydrierte Tripeptid (XVII) ist bereits in Essigester unlöslich und kann aus wenig heißem Äthanol

mit Essigester kristallisiert werden. Verknüpfung mit BOC-L-hydroxyprolin ergab das Tetrapeptid BOC-L-hydroxyprolyl-L-alanyl-L-tryptophyl-D,L-hydroxyleucinamid (XVIII), das gut wasserlöslich, und ebenfalls in Essigester unlöslich ist. Dieser Umstand zwang zur modifizierten Aufarbeitung. Die nicht umgesetzten Reaktionskomponenten wurden durch Waschen mit saurem und basischen Polystyrol - Ionenaustauscher aus der wäßrigen Lösung des Reaktionsgemischs entfernt. Durch Adsorption - wahrscheinlich bedingt durch das aromatische Indol - traten merklich Substanzverluste auf. (XVIII) kristallisiert aus heißem Essigester.

Mit wasserhaltiger Trifluoressigsäure wurden gleichzeitig der BOC-Rest abgespalten und die Amidschutzgruppe in das Lacton verwandelt. Beide Reaktionen liefen vollständig ab, wie einerseits das Pherogramm pH 1,9/Ninhydrin, andererseits das IR-Spektrum (CO-Schwingung bei einer Frequenz von 1768 cm^{-1}) zeigten. Trotzdem erwies sich dieser Reaktionsschritt als ungünstig, bedingt durch die Säurelabilität des Tryptophans. Schon nach kurzer Zeit färbte sich der Ansatz rotbraun; das Dünnschichtchromatogramm (Kieselgel G/Meth./Chlorof./1/1/Zimtaldehyd/HCl) zeigte neben dem Hauptprodukt (XIX) 5 weitere tryptophanhaltige Substanzen in geringer Konzentration. Merkwürdi-

gerweise färbten sich 2 dieser Substanzen mit Zimtaldehyd/HCl blau an (phalloinartig), 1 rotviolett (amanitinartig), während (XIX) und die beiden anderen Verunreinigungen eine braune Farbe zeigten (tryptophanartig). Das Phänomen wurde nicht näher untersucht.

Das roh erhaltene braune Öl (XIX) löste sich in kaltem Isopropanol unter Ausscheidung rötlicher Kristalle, die auch in heißem Isopropanol unlöslich waren. (XIX) war auch durch mehrmaliges Umkristallisieren aus wenig heißem Methanol/Isopropanol/abs. Äther nicht von seinen Begleitsubstanzen zu befreien. Da die unter Chlorwasserstoffabspaltung verlaufende Thioäthersynthese die Skala der Verunreinigungen abermals erweitert hätte, wurde dieses Tetrapeptid nicht weiterverarbeitet und eine Synthese des Tetrapeptids angestrebt, die ohne diesen wässrig-sauren Reaktionsschritt verläuft.

b. Tetrapeptidamid. Es bot sich an, statt BOC-L-hydroxyprolin das Cbo-L-hydroxyprolin in die Synthese einzusetzen, dessen Schutzrest auf der Stufe des Tetrapeptids durch Hydrierung zu entfernen war. Gleichzeitig wurde der stufenweise Aufbau aufgegeben, da der Zusammenbau zweier Dipeptide ökonomischer schien.

Cbo-L-hydroxyprolin wurde nach der Methode der gemischten Anhydride mit L-Alaninmethylester-hydrochlorid verknüpft, der entstandene Dipeptidester (XX) mit Hydrazinhydrat zum Cbo-L-hydroxypropyl-L-alaninhydrazid (XXI) umgesetzt. Alle Stufen konnten durch Kristallisation gereinigt werden.

(XXI) wurde nach der Azidmethode (29) mit dem bereits beschriebenen (s.S. 26) L-Tryptophyl-D,L-hydroxyleucinamid (XV) zum Cbo-L-hydroxypropyl-L-alanyl-L-tryptophyl-D,L-hydroxyleucinamid (XXII) verbunden. Als Reaktionsmedium diente eine Mischung von Essigester/Dimethylformamid 3 / 1. (XXII) ist deutlich weniger wasserlöslich als das BOC-geschützte Tetrapeptid, dennoch mußte wieder mit Ionenaustauschern aufgearbeitet werden, diesmal durch Waschen einer methanolisch-wäßrigen Lösung des Reaktionsgemischs.

(XXII) fällt - abgesehen von geringen Mengen Tetrapeptidlacton - chromatographisch rein an. Der Cbo-Rest wurde durch Hydrierung abgespalten. Mit Trifluoressigsäure in das Salz überführt, konnte das L-Hydroxypropyl-L-alanyl-L-tryptophyl-D,L-hydroxyleucinamid-trifluoracetat (XXIII) chromatographisch und pherographisch rein erhalten werden - wieder abgesehen von geringen Mengen des entsprechenden Lactons (XIX). (XXIII) kristallisierte nicht, konnte aber gut roh in die Thioäthersynthese eingesetzt werden.

3. Synthese des cysteinhaltigen Tripeptids.

BOC-D-threonin ist ein viskoses, gelbliches Öl, das noch ca. 20% Essigester festhält. Nach einer titrimetrischen Gehaltsbestimmung des Öls (n_{10}^D NaOH, Phenolphthalein) wurde das gemischte Anhydrid bereitet und mit (S-Benzyl)-L-cysteinmethylester-hydrochlorid umgesetzt. Das entstandene Dipeptid (XXIV) wurde kristallin isoliert und die Aminoschutzgruppe mit Trifluoressigsäure abgespalten. Das Trifluoracetat (XXV) ist ein gelbes Öl, das roh mit BOC-L-alanin - über das gemischte Anhydrid - zum kristallinen BOC-L-alanyl-D-threonyl-(S-benzyl)-L-cysteinmethylester (XXVI) umgesetzt wurde.

Verseifung in Dioxan/H₂O lieferte die kristalline, in Essigester bereits schwer lösliche Tripeptidsäure (XXVII). Nun beschreibt J.A. Maclaren (19) bei der Verseifung von Cbo-glycyl-L-(S-benzyl)-cysteinäthylester weitgehende Racemisierung infolge des induktiven Effekts des Schwefels als β -Substituent. Da auch in unserem Fall mit einer solchen Racemisierung gerechnet werden mußte, wurde die erhaltene Tripeptidsäure BOC-L-alanyl-D-threonyl-(S-benzyl)-L-cystein (XXVII) mit Carboxypeptidase inkubiert.

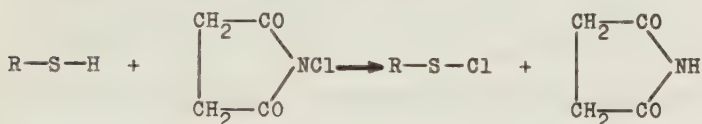
Es wurde nur sehr wenig (S-Benzyl)-cystein gefunden, es konnte jedoch gezeigt werden, daß das ursprüngliche Tripeptid (XXVII) nur noch zu $< 3\%$ erhalten blieb, und daß überhaupt kein Threonin entstanden war. Somit war bewiesen, daß einerseits der enzymatische Abbau vor dem D-Threonin anhält, andererseits die Racemisierung sehr gering war. Dafür sprach auch die gute Kristallisierbarkeit des Produkts.

Zur Entfernung der Schutzgruppe am Schwefel wurde (XXVII) in flüssigem NH_3 gelöst und mit Na reduziert. Das debenzylierte Tripeptid BOC-L-alanyl-D-threonyl-L-cystein (XXVIII) wurde aus citronensaurer, NaCl-gesättigter Lösung mit Essigester extrahiert, und fiel roh als farbloses Öl an. Dieses Öl löste sich leicht in Chloroform und Essigester, fiel jedoch nach wenigen Sekunden aus beiden Lösungsmitteln quantitativ und kristallin aus. Die aus Chloroform erhaltenen Kristalle schließen bei der Kristallisation Chloroform ein: sie sind auch nach scharfem Trocknen (70° , 1 Torr, P_2O_5 und KOH) noch 8 - 15% schwerer als das eingesetzte rohe Öl. Eine quantitative Analyse des scharf getrockneten Produkts lieferte einen Chlorgehalt von 14,47%. Kristallines (XXVIII) löst sich noch gut in Wasser, niedrigen Alkoholen und Tetrahydrofuran.

Zur B e s t i m m u n g d e s S H - G e h a l t e s
wurde mit $\frac{n}{100}$ Jod-Jodkalium-Lösung oxydiert und der
Überschuß mit $\frac{n}{100}$ Thiosulfat-Lösung zurücktitriert.
Die Titration ergab nahezu 100% SH-Gehalt. Dieses Tri-
peptid (XXVIII) diente als Schwefelkomponente zur
Thioäthersynthese.

4. Synthese und Isolierung des Thioäthers.

a. Synthese. Zur Thioäthersynthese diene das BOC-L-alanyl-D-threonyl-L-cysteinsulfenylchlorid, das aus N-Chlorsuccinimid und (XXVIII) in situ gebildet wird:



Infolge des elektronegativen Substituenten ist der Schwefel zur elektrophilen Substitution in der α -Stellung des Indolringes befähigt:



Das Prinzip dieser Reaktion geht zurück auf H. Fischer (30). Von Th. Wieland und Mitarbeitern (31) wurde sie zuerst zur Darstellung von Thioäthern aus aliphatischen Sulfensäurechloriden und Indolen angewandt; weitere Erfahrungen, besonders mit Cystein- und Tryptophanderivaten sammelten K. Freter (32), E. Groß (33), G. Schupfner (34) und R. Sarges (26).

Die Sulfenylchloridbildung geschieht unter Rühren einer Lösung der Cysteinkomponente in trockenem Chloroform/Tetrahydrofuran unter Stickstoff bei -15°C mit suspendiertem N-Chlorsuccinimid. Die Chlorierung des Schwefels ist stark abhängig von der Größe des Cysteinpeptids: So konnte R. Sarges (26) zeigen, daß Cystein im Verband eines Heptapeptids überhaupt kein Sulfenylchlorid mehr bildet; die Bildung des oben genannten Tripeptidsulfenylchlorids beansprucht mindestens 1 Stunde, während nach R. Sarges BOC-L-cysteinsulfenylchlorid, also die chlorierte Aminosäure, innerhalb $1/2$ Stunde entsteht.

Die t r y p t o p h a n h a l t i g e Komponente wird üblicherweise in Tetrahydrofuran, notfalls - und so auch im Falle des hydrophilen Tetrapeptids (XXIII) - in trockenem Dimethylformamid gelöst. Zur aromatischen Substitution läßt man 1 Stunde bei -15°C , 1 weitere Stunde bei Zimmertemperatur reagieren.

Anlaß zur Bildung mannigfacher Nebenprodukte gab der bei der Thioäthersynthese entbundene C h l o r w a s s e r s t o f f, dem das Reaktionsgemisch 2 Stunden lang ausgesetzt war. Vorauszusehen waren 3 säurekatalysierte Nebenreaktionen, die auch alle beobachtet wurden:

- Verharzung des Indols; der Ansatz färbte sich sofort nach Zugabe der Tryptophankomponente rot.
- BOC-Abspaltung; es entstanden Produkte, die sich mit Ninhydrin violett anfärbten wie Alanin, obwohl nur die gelbe Farbe des Hydroxyprolins erscheinen durfte.
- Umwandlung des Hydroxyleucinamids in Hydroxyleucinlacton bei Anwesenheit katalytischer Mengen Wasser.

Die letztgenannte Reaktion läßt sich durch extreme Trocknung nahezu völlig unterbinden. Sie war jedoch aus zweierlei Gründen erwünscht: einmal wurde Chlorwasserstoff als NH_4Cl gebunden, und so die BOC-Abspaltung unterdrückt; zum anderen wurde so eine adsorptionschromatographische Aufarbeitung erst möglich, da sich Tetrapeptid und Thioäther nur in Form ihrer Lactone, nicht aber in Form ihrer Amide chromatographisch trennen lassen. Zudem erwies sich der Verlust der Amidschutzgruppe für die Cyclisierung als unerheblich (s.S.39).

b. Reinigung. Das aus dem Thioätheransatz durch Ausfällen mit trockenem Äther roh isolierte Reaktionsgemisch enthielt mindestens 11 Produkte, darunter 3 Thioäther. Nach adsorptionschromatographischer Trennung an einer Sephadex G 25-Dextrangelsäule mit H_2O als Fließmittel und automatischer Registrierung durch ein Durchflußphotometer UVICORD 4701 A (LKB) bei 253,7 m μ (s. automatische

Aufzeichnung S. 36' - konnten nahezu alle Produkte photographisch und chromatographisch identifiziert werden:
Peak A enthält nur Cysteinekomponente, die völlig an

Disulfid oxydiert ist, und zwar als

- $\text{Sis}-(\text{BOC-L-alanyl-D-threonyl-L-alanin(S-yl)})$ -disulfid,
- $\text{Sis}-(\text{L-alanyl-D-threonyl-L-alanin(S-yl)})$ -disulfid,
- $(\text{BOC-L-alanyl-D-threonyl-L-alanin(S-yl)})$ -
(L-alanyl-D-threonyl-L-alanin(S-yl))-disulfid

Der Hauptanteil der ehemaligen Tyrosinkomponente (XXVIII) lässt sich jedoch - ebenso wie das Succinimid - nicht mit Äther ausfällen und wurde daher schon bei der ersten Isolierung abgetrennt.

Peak B enthält veränderte Tetrapeptidkomponente:

- L-Hydroxyprolyl-L-alanyl-L-tryptophyl-D,L-hydroxy-leucinlacton (XIX) und
- eine weitere nicht identifizierbare Komponente (neutral, hydroxyprolinendständig, nicht substituiertes Tryptophan)

Peak C enthält den erwünschten Thioether:

- (L-Hydroxyprolyl-L-alanyl-L-tryptophyl-und-D-yl)-D,L-hydroxy-leucinlacton'-(BOC-L-alanyl-D-threonyl-L-alanin(S-yl))-sulfid (XXII) daneben
- in der Schulter dieses Peaks wahrscheinlich noch Teile des entsprechenden Thioetheramids.

Peak D enthält den durch Abspaltung des BOC-Restes zur Base gewordenen Thioether:

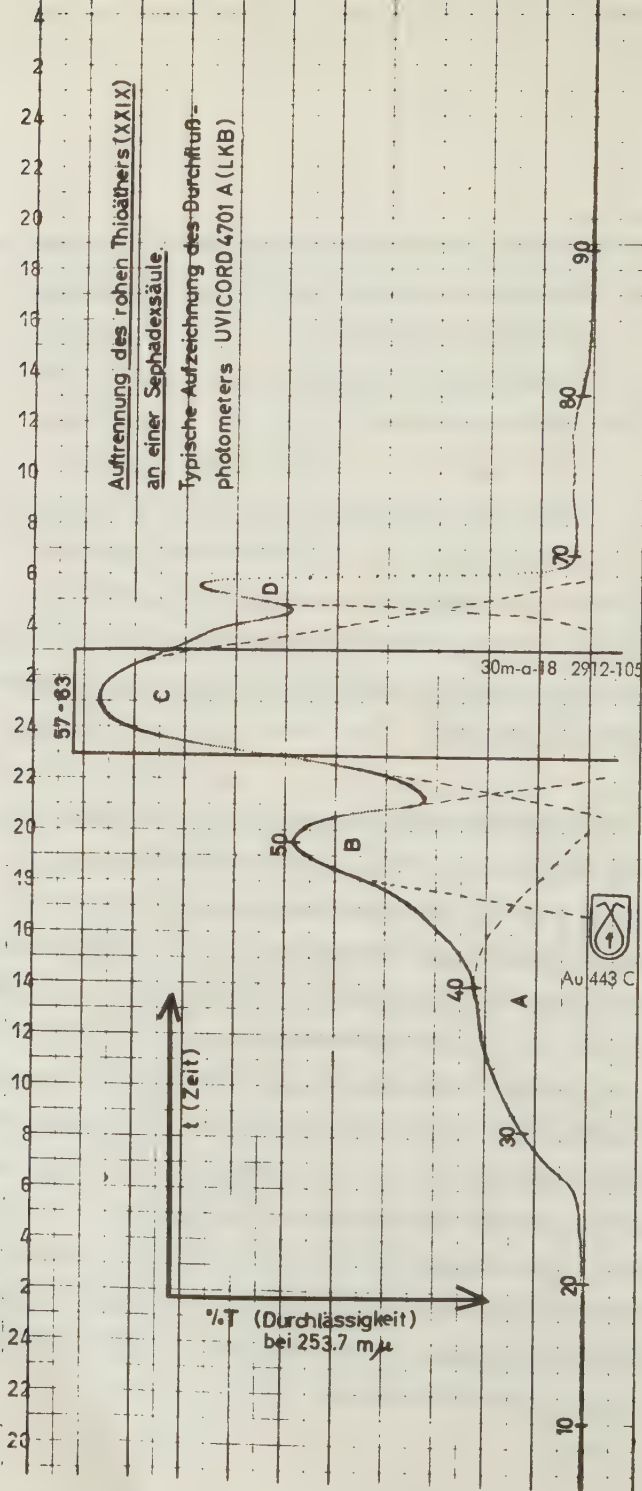
- (L-Hydroxypropyl-L-alanyl-L-tryptophyl(ind-2-yl)-hydroxyleucinlacton)-(L-alanyl-D-threonyl-L-alanin(β -yl))-sulfid daneben
- L-Hydroxypropyl-L-alanyl-L-tryptophyl-D,L-hydroxyleucinamid und
- : 2 weitere nicht identifizierbare Folgeprodukte des Tetrapeptids (basisch, hydroxyprolin-endständig, nicht substituiertes Tryptophan).

Isoliert wurde Peak C (s. automatische Aufzeichnung S. 38). Die noch thioätherhaltigen Fraktionen zur linken und rechten wurden gesammelt und nochmals der gleichen Prozedur unterworfen.

Der so schätzungsweise bis auf 80% angereicherte Thioäther, der noch als Trifluoracetat bzw. Hydrochlorid vorlag, wurde erneut einer adsorptionschromatographischen Fraktionierung an Sephadex G 25 - Dextrangel auf einer 2 m langen Säule mit H_2O als Fließmittel unterworfen. Der Zusatz stöchiometrischer Menge Triäthylamin sollte das Säureanion binden. Das aus dieser Trennung isolierte Produkt, ein weißes amorphes Pulver, war mindestens zu 95% einheitlicher Thioäther (XXIX), wie die nahezu ideale Glockenkurve der automatischen Aufzeichnung des Photometers zeigte und wie auch die Pherogramme bei pH 1,9 und 6,5/ Ninhydrin und Zimtaldehyd/HCl sowie das Dünnschichtchromatogramm (Kieselgel G/Meth./Chlorof./1/1/Ninhydrin und Zimtaldehyd/HCl) auswiesen.

Auftrennung des rohen Thioäthers (XXIX)
an einer Sephadexsäule

Typische Aufzeichnung des Durchfluß-
 photometers UVICORD 4701 A (LKB)



5. Cyclisierung

Der durch Säulentrennung gereinigte Thioäther (XXIX) ist in abs. Äthanol zwar quellbar, aber unlöslich. Er wurde in abs. Methanol in der Hitze gelöst und mit abs. Äthanol auf das Verdünnungsverhältnis 1:2000 gebracht. Bei 55°C wurde mit einem 175-fachen Überschuß an Äthoxyacetylen 36 Stunden lang cyclisiert.

Das entstandene Cyclo-(boc-L-alanyl-D-threonyl-L-alanyl(β -yl)-L-hydroxyprolyl-L-alanyl-L-tryptophyl(ind-2-yl)-D,L-hydroxyleucinlacton)-sulfid (XXX) zeigte im Dünnschichtchromatogramm (Kieselgel G/Essigester/Meth./1/1/Zimtaldehyd/HCl) einen R_F -Wert von 0,67 gegenüber einem R_F -Wert von 0,05 des offenen Thioäthers, der also praktisch am Start liegen blieb. Es wurde daher eine adsorptionschromatographische Trennung an der Kieselgelsäule mit Essigester/Meth./1/1 als Fließmittel einer präparativen elektrophoretischen Trennung bei pH 1,9 vorgezogen.

Neben der erwünschten Reaktion der aktivierten COOH-Gruppe des Cysteins mit der Iminogruppe des Hydroxyprolins mußte mit der Iminolyse des γ -Lactons durch das Hydroxyprolin gerechnet werden, also ebenfalls einer intramolekularen Cyclisierung unter Bildung eines cyclischen, tryptophanhaltigen Tetrapeptids, das über seinen Thioäther

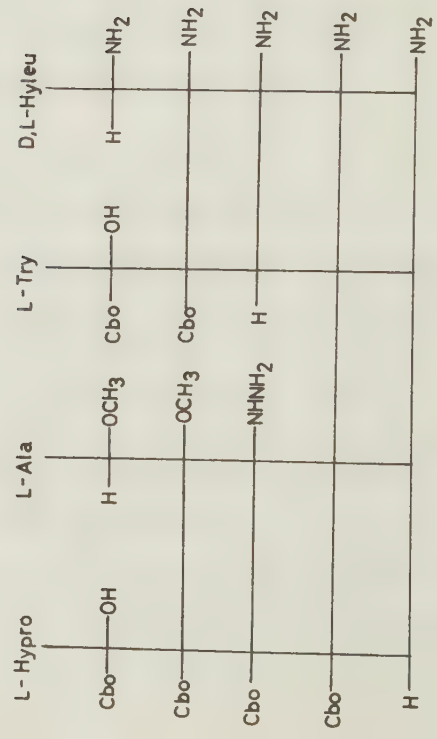
mit dem Tripeptid verknüpft wäre, also:

Cyclo-(D-L-hydroxyleucyl-L-hydroxypropyl-L-alanyl-L-tryptophyl(ind-2-yl))-(boc-L-alanyl-D-threonyl-L-alanin(β -yl))-sulfid. Dieses Produkt wurde nicht gefunden. Es rechtfertigt sich also der Verzicht auf die bei der Thioäthersynthese verlorengegangene Amidschutzgruppe am Hydroxyleucin.

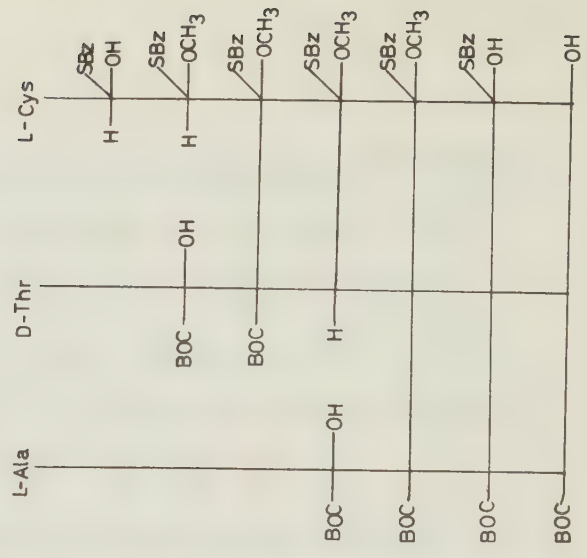
Daß die Aminolyse des Hydroxyleucinlactons keine leicht ablaufende Reaktion ist, daraufhin deuten die auch bei der Bicyclisierung gemachten Versuche mit Cbo- γ -D,L-hydroxyleucinlacton und L-Phenylalanin-t-butylester, die sämtlich negativ verliefen (s.S.50).

Der Monocyclus (XXX) ist ungiftig, zeigt aber, - ähnlich dem von R. Sarges (26) synthetisierten bicyclischen Modell: Bicyclo-(L-alanyl-D-threonyl-L-alanyl(β -yl)-L-hydroxypropyl-L-alanyl-L-tryptophyl(ind-2-yl)-L-leucyl)-sulfid - an letal phalloidinvergifteten Mäusen eine Antigiftwirkung. (50 mg/kg weiße Maus). Somit scheint die Antigiftwirkung - außer an das Vorhandensein eines Thioäthers - nicht an die bicyclische Gestalt der Molekel gebunden zu sein. Es genügt vielmehr die Acylierung der freien NH_2 -Gruppe, ein Hinweis, der durch eine Acylierung authentischen Secophalloins noch zu erhärten wäre.

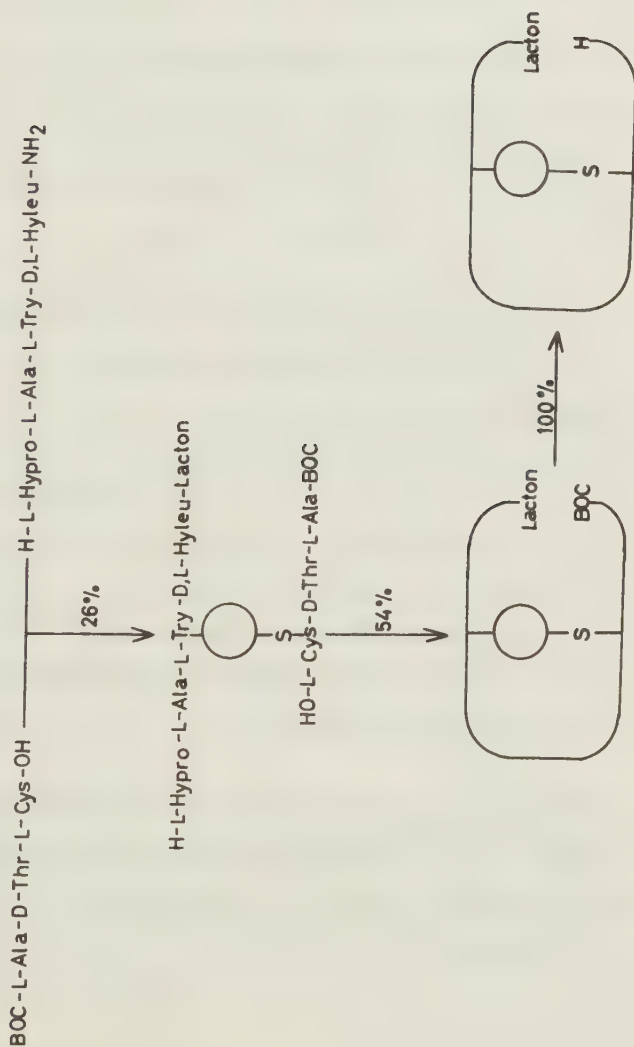
Synthese des Tetrapeptidamids (XXIII) :



Synthese des Tripeptids (XXVIII) :



Synthèse des ⁶L-Hypro-7 D,L-Hyleu-7 Secophalloin-trifluoracetats (XXXI) aus (XXIII) und (XXVIII) :



7. Identifizierung des synthetischen ⁴L-Hypro-⁷D,L-Hyleu-Secophalloins.

Nach der Abspaltung des BOC-Restes mit Trifluoressigsäure sollte das erhaltene monocyclische Produkt - ⁴L-Hypro-⁷D,L-Hyleu-Secophalloin-trifluoracetat (XXXI) - physikalisch und chemisch weitgehend dem authentischen Secophalloin - trifluoracetat gleichen.

a. Die Totalhydrolyse des synthetischen Secophalloins mit halbkonzentrierter Salzsäure 12 Stunden bei 110°C lieferte alle geforderten Aminosäuren, die im Pherochromatogramm identifiziert werden konnten:

Cystin (grau), Threonin (grauviolett), Hydroxyprolin (gelb), Alanin (violett, doppelte Größe), Oxytryptophan (rötlichviolett), und Hydroxyleucinlacton (olivbraun). Oxytryptophan läßt sich von Tryptophan gut unterscheiden; letzteres färbt sich mit Ninhydrin grau an und läuft im Chromatogramm H deutlich weiter.

b. Die Elektrophorese bei pH 6,5; 1 Stunde, 80 mA, Ninhydrin, zeigte eine einheitliche Substanz. Ihr R_F -Wert war der gleiche wie der des Secophalloins vom Pilz. (s. Pherogramm S. 48).

Mit Zimtaldehyd färbte sich diese Bande blau. Beide Proben - synthetisches Secophalloin (SS) und als Vergleich Pilzsecophalloin (PS) - enthielten noch Neutralkörper, die sich durch Kataphorese - wohl zufällig - gleichweit vom Start entfernten. Beide neutrale Verunreinigungen enthielten Thioäther, waren aber sicher nicht identisch (s.S.48).

Die Elektrophorese bei pH 1,9 zeigte ebenfalls ein einheitliches Produkt, dessen Wanderungsgeschwindigkeit mit dem des Pilzsecophalloins übereinstimmt.

c. Im Papierchromatogramm "G" zeigten sich Unterschiede im R_F -Wert, und zwar:

Synthetisches Secophalloin: $R_F = 0,37$

Pilz- Secophalloin: $R_F = 0,48$

ebenfalls im Papierchromatogramm "H":

Synthetisches Secophalloin: $R_F = 0,40$

Pilz- Secophalloin: $R_F = 0,50$

d. Im Dünnschichtchromatogramm auf Kieselgel G liefen synthetisches und natürliches Produkt zum Teil gleich, zum Teil etwas verschieden, abhängig vom Lösungsmittel. Am größten waren die Unterschiede in rein organischer Phase (abs. Methanol):

(KieselgelG/Meth./Nin. und Zimt./HCl)

Synthetisches Secophalloin: $R_F = 0,49$

Pilz- Secophalloin: $R_F = 0,37$

(KieselgelG/Meth./H₂O/1/1/Nin. und Zimt./HCl)

Synthetisches Secophalloin: $R_F = 0,38$

Pilz- Secophalloin: $R_F = 0,36$

(KieselgelG/But./Eis./Pyr./H₂O/30/6/20/24/Nin.u.Zimt.)

Synthetisches Secophalloin: $R_F = 0,71$

Pilz- Secophalloin: $R_F = 0,71$

(s. Aufzeichnung der Dünnschichtchromatogramme S. 49).

e. Das UV-Spektrum zeigt ein Absorptionsmaximum bei 292 m ; diese Eigenschaft ist jedoch völlig unspezifisch und allen Tryptathioninderivaten eigen.

f. Die Bestimmung des Drehwertes scheiterte an der Unmöglichkeit chromatographisch reines Secophalloin zu isolieren (s.S.51). Beide Produkte, sowohl das synthetische als auch das natürliche Secophalloin sind ja - wie das Pherogramm pH 6,5 Zimtaldehyd/HCl ausweist - von geringen Mengen an Neutralstoffen behaftet, so daß ein sauberer Vergleich nicht möglich ist.

Die U n t e r s c h i e d e im chromatographischen und dünnschichtchromatographischen Verhalten können durch

den Ersatz des L-allo-Hydroxyprolins durch L-Hydroxyprolin bedingt sein. Wie das Kalottenmodell zeigt, ragt im Fall des L-Hydroxyprolins die OH-Gruppe weiter aus dem Gesamtmolekül heraus als im Falle des L-allo-Hydroxyprolins. Von Interesse mag in diesem Zusammenhang auch die Tatsache sein, daß L-Hydroxyprolin im Pherogramm pH 1,9 weniger weit zur Kathode läuft als L-allo-Hydroxyprolin (35), und daß Cbo-L-hydroxyprolin im Pherogramm pH 6,5 etwas weiter zur Anode läuft, als Cbo-L-allo-hydroxyprolin (43). Die Stellung der OH-Gruppe bestimmt also nicht nur das chemische Verhalten dieser Aminosäure (Lactonbildung der allo-Form), sondern auch das physikalische Verhalten weitgehend mit.

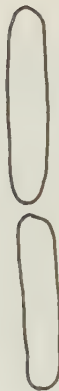
ELEKTROPHEROGRAMM pH 6.5
 1 STUNDE 80mA NINHYDRIN
 SS = SYNTH. SECOPHALLOIN
 PS = PILZ - SECOPHALLOIN



SS

PS

ELEKTROPHEROGRAMM pH 6.5
 1 STUNDE 80mA ZIMTALDEHYD/HCl



SS

PS

METHANOL / NIN.	METHANOL / ZIMT.	METHANOL 1 WASSER 1 / NIN.	METHANOL 1 WASSER 1 / ZIMT.	BUTANOL 30 EISESSIG 6 PYRIDIN 20 WASSER 24 / NIN.	BUTANOL 30 EISESSIG 6 PYRIDIN 20 WASSER 24 / ZIMT.
  	  	 	   	 	  
x SS	x SS	x SS	x SS	x SS	x SS
x PS	x PS	x PS	x PS	x PS	x PS

8. Versuche zur Bicyclisierung

Versuche, durch Recyclisierung einer Seco-Form wieder zu giftigen Bicyclen zu gelangen, wurden von Th. Wieland und Mitarbeitern unternommen. So gelang es I. Sangl (36) durch Cyclisierung von Secoketophalloidin, also einem abgewandelten Partialhydrolysat ohne Lactongruppe, über die gemischten Anhydride wieder zu giftigem Ketophalloidin zu gelangen.

K. Vogeler (37) recyclisierte Secophalloidin - trifluoracetat in Anwesenheit von Triäthylamin durch Imidazolschmelze. Er erhielt einen phalloidinähnlichen Körper, der ungiftig war und bei abermaligem Öffnen eine andere Seco-Verbindung bildete. Es wurde daher nach anderen Möglichkeiten der Bicyclisierung gesucht.

Als Konsequenz eines Versuches zur Darstellung von D,L-Hydroxyleucinamid aus freiem D,L-Hydroxyleucinlacton und NH_3 in Methanol, bei dem neben dem Amid auch Oligomere des D,L-Hydroxyleucins gefunden wurden, bei dem also das Lacton intermolekular aminolytisch geöffnet worden war, (s.S.22) - wurde auch hier

a. die direkte Aminolyse untersucht:

Cbo-D,L-hydroxyleucinlacton und L-Phenylalanin-t-butyl-

ester in abs. Äthanol gelöst und 12 Stunden auf 55°C erhitzt, lieferte nur die Ausgangskomponenten zurück.

Der gleiche Versuch unter Zugabe von Kieselgel, das bei 140°C aktiviert worden war und diese Reaktion katalysieren sollte, hatte das nämliche Ergebnis.

Cbo-D,L-hydroxyleucinlacton wurde in 40-fachem Überschuß reinem L-Alaninmethylester, einem gelblichen Öl, gelöst, und ein Mal bei 20°C, ein anderes Mal im Bombenrohr bei 50°C aufbewahrt. Beide Ansätze enthielten nach 2 Tagen noch flüssige Phase, also neben viel Diketopiperazin noch freien Ester. Das Lacton jedoch lag noch immer unverändert vor.

Ein Versuch zur Recyclisierung des Pilz-Secophalloin-trifluoracetats mit Triäthylamin in abs. Äthanol 48 Stunden bei 80°C lieferte kein Phalloin zurück.

Der entsprechende Versuch mit freiem Secophalloin wurde aufgegeben, da es sich als unmöglich erwies, Secophalloin als freies Aminolacton zu isolieren. Bei der Säulenchromatographie an Kieselgel und Sephadex-Dextrangel von Secophalloin-trifluoracetat mit und ohne (!) Triäthylamin zerfiel die ursprüngliche Substanz in 4 - 5 polarere

Folgeprodukte. Da diese sich zu einem guten Bruchteil mit Trifluoressigsäure in Secophalloin-trifluoracetat zurückverwandeln ließen, liegt der Schluß nahe, daß die primären Veränderungen an der aktiven Oberfläche des Kieselgels auch bei Abwesenheit von Triäthylamin der Verlust des Säureanions und Zwitterionbildung sind.

b. Die Aktivierung des Hydroxyleucins als gemischtes Anhydrid wurde am Modell untersucht. Cbo-D,L-hydroxyleucinlacton wurde in sein öliges Triäthylammoniumsalz überführt, scharf getrocknet und das gemischte Anhydrid bereitet. Bereits nach 2 Minuten wurde Alaninmethylester als Basenkomponente zugegeben. Nach der Aufarbeitung hinterblieb als einzige neutrale Substanz Cbo-D,L-hydroxyleucinlacton. Ebenfalls am Modell untersucht wurde

c. die Aktivierung des Hydroxyleucins als Azid. Die Hydrozinolyse des Lactons verläuft glatt und liefert kristallines Cbo-hydroxyleucinhydrazid. Die Azidsynthese wurde etwas modifiziert, da sich aus der salzsauren Lösung des Hydrazids nach wenigen Sekunden infolge saurer Zersetzung das Cbo-hydroxyleucinlacton ausschied. Das Hydrazid wurde daraufhin in der NaNO_2 -Lösung suspendiert, gekühlt, die Säure schnell zugegeben, und das dick ausfallende Cbo-hydroxyleucinazid sofort isoliert,

kurz getrocknet und umgesetzt. Nach Aufarbeitung des Azidansatzes 2 Tage später fand sich wieder als einziges Neutralprodukt das Cbo-hydroxyleucinlacton.

Auf die analogen Versuche am Secophalloin wurde verzichtet, da offensichtlich jede Aktivierung der Carboxylgruppe des Hydroxyleucins wegen des Energiegewinns des entstehenden 5-Ringes zum stabilen γ -Lacton zurückführt.

9. Zusammenfassung und Deutung

Es wird die Synthese des $^4\text{L-Hypro-}^7\text{D,L-}\beta\text{-Hyleu-Seco-}$ phalloin-trifluoracetats beschrieben, sowie seine chemische und physikalische Identifizierung.

Das Verhalten des $\text{D,L-}\beta\text{-Hydroxyleucins}$ in der Peptidsynthese sowie eine mit vielen Nebenreaktionen behaftete Thioäthersynthese und deren Aufbereitung sind Schwerpunkte der Arbeit und werden eingehend dargelegt.

Der glänzendste Strukturbeweis des Phalloins wäre eine Toxizitätsbestimmung am synthetischen bicyclischen Produkt. Es schlugen jedoch alle Versuche fehl, vom synthetischen Secophalloinmodell zu einem Bicyclus zu gelangen.

Weitere Syntheseveruche am Phalloin sollten von der Notwendigkeit ausgehen, die lactonisierende Peptidbindung möglichst früh zu knüpfen und sie während der Thioäthersynthese vor dem schädlichen Einfluß des Chlorwasserstoffs zu schützen. Die Versuche, auf diesem Wege zu totalsynthetischem Phalloin zu gelangen, werden vom Autor fortgesetzt. Sie führten bisher zur Synthese des geschützten Pentapeptids Cbo-L-allo-hydroxypropyl-L-alanyl-L-tryptophyl-D,L-hydroxyleucyl-L-alaninmethylester.

D. Experimenteller Teil

Zur Hochspannungselektrophorese wurde Papier von Macherey, Nagel u. Co verwendet: Papier Nr. 212 zu analytischen Zwecken und Karton Nr. 827 ff zur präparativen Trennung.

Zur Papierchromatographie diente Schleicher & Schüll-Papier 2043 b. Es wurde absteigend und senkrecht zur Faser chromatographiert.

Zur Dünnschichtchromatographie diente KieselgelG von Merck.

Beim Pherochromatogramm (zur Identifizierung eines Aminosäuregemisches) folgt auf die Elektrophorese pH 1,9; 1 Stunde, 40 mA, die Chromatographie im Lösungsmittel H, 15 Stunden und senkrecht zur Elektrophoreserichtung.

Lösungsmittel für die Papierchromatographie:

G: 600 ml Methyläthylketon
 60 ml Aceton
 100 ml Wasser

H: 750 ml sec.-Butanol
 150 ml Ameisensäure
 100 ml Wasser

Pufferlösungen für die Elektrophorese:

pH 1,9: 100 ml Ameisensäure
 300 ml Eisessig
 1600 ml Wasser

pH 6,5: 20 ml Eisessig
 200 ml Pyridin
 1780 ml Wasser

Entwicklungsreagenzien:

Ninhydrin: 1,2 g Ninhydrin
30 ml 2n Essigsäure
350 ml n-Butanol
600 ml Methanol

Die trockenen Pherogramme und Chromatogramme werden mit dieser Lösung besprüht und bei 100°C entwickelt.

Fluoreszein: gesättigte Lösung (ca. 0,1%) in Methanol.

Die besprühten und getrockneten Papierbögen werden unter einer UV-Lampe betrachtet.

Chlor (44) I: 1% Lösung von t-Butylhypochlorit in Tetrachlorkohlenstoff.

II: gesättigte Lösung von o-Tolidin in 2% Essigsäure versetzt mit dem gleichen Volumen 0,05n KJ-Lösung.

Die frisch getrockneten Pherogramme und Chromatogramme werden mit Lösung I besprüht und 3-4 Minuten bei 80-100°C getrocknet, bevor sie mit Lösung II entwickelt werden.

Zimtaldehyd: 2,5% Lösung in Methanol

Die besprühten Proben werden kurz getrocknet und in möglichst feuchter, gesättigter HCl-Atmosphäre entwickelt.

Die Schmelzpunkte sind unkorrigiert und wurden in der Kapillare im Kupferblock bestimmt.

1. Cbo-(S-benzyl)-L-cysteinyl-L-alanyl-L-prolyl-(S-benzyl)-L-cysteinyl-L-leucyl-L-alanyl-D-threonin
($C_{49}H_{65}O_{11}N_7S_2$) (M = 992,29)

0,0001 molarer Ansatz: 106 mg Cbo-Heptapeptidmethylester
0,11 ml 1n NaOH'
20 ml Dioxan, H_2O

Alkalische Verseifung:

Der Ester wird in Dioxan (über KOH destilliert) gelöst und mit 1,1 Äquivalenten 1n NaOH versetzt. Man vibriert unter Zugabe von H_2O , bis das Volumen des Ansatzes sich verdreifacht hat (1Std.). Das Lösungsmittel und ein Teil des H_2O werden i.V. abgezogen, die wäßrige Lösung des Na-Salzes wird einmal ausgeestert. Die Peptidsäure wird mit 1n HCl gefällt, in Essigester aufgenommen, über $MgSO_4$ getrocknet und isoliert.

Amorph.

Ausbeute (roh): 96%

2. t-BOC-(S-benzyl)-L-cystein
($C_{15}H_{21}O_4NS$) (M = 311,41)

0,01 molarer Ansatz: 3,25 g t-BOC-(S-benzyl)-L-cysteinmethylester
11 ml 1n NaOH
60 ml Dioxan
60 ml H_2O

Der Ester wird im Dioxan gelöst und mit der NaOH ver-

setzt. Dabei fällt die äußerst lipophile Substanz aus. Mit Methanol wird einphasig gemacht und 2 Stunden bei Zimmertemperatur unter Zugabe des H_2O vibriert. Das Dioxan wird i.V. abgezogen, die Säure mit Citronensäure ausgefällt. Aus Äther/Petroläther nach tagelangem Stehen kristallin. Die Substanz enthält offensichtlich Kristallwasser, da sie beim Stehen über $CaCl_2$ Kristalle liefert, die 65° höher schmelzen.

Fp. I $42^\circ C$

Fp. II $107^\circ C$

Ausbeute: 85%

3. t-BOC-L-alanin



(M = 189,22)

0,1 molarer Ansatz:

8,9 g L-Alanin
5,0 g MgO (25% Überschuß)
17,1 g t-BOC-Azid (20% Überschuß)
80 ml H_2O
180 ml Dioxan (KOH dest.)

BOC-Aminosäure:

Die Aminosäure und das MgO werden unter Rühren im H_2O aufgeschlämmt, das t-BOC-Azid im Dioxan gelöst und zugefügt. Es wird 20 Stunden bei $45^\circ C$ heftig gerührt, dann vom MgO und $Mg(N_3)_2$ abgesaugt, Dioxan und H_2O bis auf $1/5$ des Volumens i.V. abgezogen, 2 mal mit Essigester ausgezogen und mit Citronensäure auf pH 4 gebracht. (Vorsicht HN_3 !) Die t-BOC-Aminosäure fällt aus. Es wird mehrmals mit Essigester ausgezogen, über $MgSO_4$ getrocknet, das Lösungsmittel i.V. abgedampft.

Leicht gelbes Öl, das an der Luft kristallisiert. Die rohen Kristalle lassen sich aus Äther/Petroläther umkristallisieren, das Öl nicht. Beim scharfen Trocknen geht Kristallwasser verloren und es entsteht eine höher schmelzende Kristallart.

Fp. I 61°C

Fp. II 82°C

Ausbeute: 66%

4. t-BOC-L-alaninthiophenylester

(C₁₄H₁₉O₃NS)

(M = 281,38)

0,057 molarer Ansatz:

10,8 g t-BOC-L-alanin

8,3 ml Triäthylamin

5,4 ml Chlorameisensäureäthylester

200 ml THF

6,3 g = 5,83 ml Thiophenol

Die Anhydridlösung wird auf bekannte Weise dargestellt, und das Thiophenol zugegeben. Man schüttelt, bis das Reaktionsgemisch Zimmertemperatur erreicht hat, löst dann das ausgeschiedene Salz in H₂O auf und destilliert das Lösungsmittel i.V. ab. Der Ester scheidet sich kristallin und leicht violett gefärbt aus. Umkristallisiert aus Äther/Petroläther.

Fp. 118 - 119°C

Ausbeute: 76%

5. t-BOC-L-alanyl-L-prolin (I)

 $(C_{13}H_{22}O_5N_2)$ $(M = 286,34)$

0,044 molarer Ansatz: 12,4 g t-BOC-L-alaninthiophenyl-
ester
90 ml THF
5,1 g L-Prolin
44 ml 1n NaOH

Der Thiophenylester wird in THF gelöst, mit der wäßrigen Lösung des Prolin-Salzes versetzt, und Methanol bis zur Homogenität des Gemischs zugegeben. Es wird 4 Stunden auf 60 - 65°C am Rückfluß erhitzt, dann zur Entfernung des Thiophenols in H₂O aufgenommen und ausgeäthert. Nach dem Ansäuern mit Citronensäure fällt das Peptid aus und wird, nach Sättigung der wäßrigen Phase mit NaCl, in Essigester aufgenommen, über MgSO₄ getrocknet und isoliert. Umkristallisiert aus H₂O (weiße Nadeln vom Fp. 123°C) oder aus wenig MeOH/Äther/Petroläther (ebenfalls weiße Nadeln, vom Fp. 157°C).

Ausbeute: 67%

6. t-BOC-L-alanyl-L-prolyl-(S-benzyl)-L-cysteinmethylester (II)

$$(C_{24}H_{35}O_6N_3S)$$
 $(M = 493.63)$

0,02 molarer Ansatz:

5,74 g (I)
2,84 ml Triäthylamin
1,9 ml Chlorameisensäureäthylester
120 ml THF abs.
5,22 g (S-Benzyl)-L-cysteinmethylester-hydrochlorid
3,0 ml Triäthylamin
80 ml THF abs.

Anhydridsynthese:

Lösung I:

Der aminogeschützte Reaktionspartner wird in THF gelöst, mit dem Triäthylamin versetzt, und im Eis/NaCl-Bad auf -15°C gekühlt (ungefähr 15 Minuten); sodann wird der Chlorameisensäureäthylester zupipetiert und das Reaktionsgemisch unter gelegentlichem Umschütteln weitere 5-8 Minuten im Kältebad belassen.

Lösung II:

Ungefähr 5 Minuten vor der Vereinigung beider Lösungen wird die carboxylgeschützte Komponente (Hydrochlorid) in THF suspendiert, mit dem Triäthylamin freigesetzt und H_2O bis zur Lösung des Salzes zugegeben.

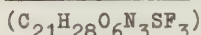
Nach der Vereinigung von I und II wird der Ansatz so lange geschüttelt, bis er Raumtemperatur erreicht hat. Es wird öfters der Stopfen angehoben, um evtl. Überdruck von CO_2 entweichen zu lassen. Geringer Überdruck ist nicht immer ein Zeichen von schlechter Reaktion.

Das THF wird i.V. entfernt, es hinterbleiben wenig Wasser und das meist ölige und wasserunlösliche Produkt. Man nimmt in Essigester auf, wäscht 3 mal mit 1n HCl (bei BOC-Peptiden 3 mal mit Citronensäurelösung), dann 3 mal mit H_2O und 3 mal mit 5% KHCO_3 -Lösung. Mit wenig H_2O wird restliche Lauge entfernt, dann über MgSO_4 getrocknet, und das Rohprodukt durch Abdampfen des Lösungsmittels i.V. isoliert.

Die Substanz kann kristallin erhalten werden; es wurde jedoch darauf verzichtet, da die übernächste Stufe spontan kristallisierte.

Ausbeute (roh): 69%

7. L-Alanyl-L-prolyl-(S-benzyl)-L-cysteinmethylester-trifluoracetat (III)



(M = 507,55)

0,01 molarer Ansatz:

4,93 g (II)

20 ml Trifluoressigsäure

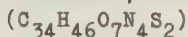
BOC-Abspaltung:

Das Peptid wird mit der 5-10-fachen Menge Trifluoressigsäure übergossen und leicht geschüttelt, bis es vollständig gelöst ist. Starke Gasentwicklung. Man läßt 1¹/₂ - 2 Stunden stehen und entfernt dann die Trifluoressigsäure weitgehend i.V. Durch häufiges Übergießen mit abs. Äther und erneutes Abdampfen i.V. kann die anhaftende Trifluoressigsäure weitgehend entfernt werden. Das Öl wird schließlich mit abs. Äther durchgearbeitet.

Diese Behandlung führt jedoch in diesem Falle auch bei häufiger Wiederholung nicht zu einem festen amorphen Produkt. Auch die Trifluoressigsäure kann nicht restlos entfernt werden.

Ausbeute nicht bestimmbar; roh weiterverarbeitet.

8. t-BOC-(S-benzyl)-L-cysteinyl-L-alanyl-L-prolyl-(S-benzyl)-L-cysteinmethylester (IV)



(M = 686,91)

0,0064 molarer Ansatz:

2,0 g t-BOC-(S-benzyl)-L-cystein

0,92 ml Triäthylamin

0,61 ml Chlorameisensäureäthylester

60 ml THF

3,9 g (III) (20% Übersch.)

1,4 ml Triäthylamin (50% Übersch.)

60 ml THF

Anhydridsynthese (analog 6)

Um das relativ kostbare t-BOC-(S-benzyl)-cystein voll auszunutzen, wird das rohe Tripeptid mit 20% Überschuß in die Synthese eingesetzt. Letzteres enthält noch freie Trifluoressigsäure, so daß der hohe Überschuß an Triäthylamin erforderlich scheint. Umkristallisiert aus Essigester/Petroläther.

Fp. 107 - 108°C

Ausbeute: 77%

Analyse:

	C	H	N	S
ber.	59,45%	6,75%	8,16%	9,34%
gef.	59,43%	6,65%	8,14%	9,26%

9. t-BOC-(S-benzyl)-L-cysteinyl-L-alanyl-L-prolyl-

(S-benzyl)-L-cystein (V)

(C₃₃H₄₄O₇N₄S₂)

(M = 672,88)

0,02 molarer Ansatz:

1,38 g (IV)
2,2 ml in NaOH
10 ml Dioxan

Verseifung (analog 1.)

Amorph.

Ausbeute: 86%

10. t-BOC-(S-benzyl)-L-cysteiny-L-alanyl-L-prolyl-
(S-benzyl)-L-cysteiny-L-leucyl-L-alanyl-D-threo-
ninmethylester (IV)
 (C₄₇H₆₉O₁₁N₇S₂) (M = 972,26)

0,00173 molarer Ansatz: 1,16 g (V)
 0,25 ml Triäthylamin
 0,17 ml Chlorameisensäureäthyl-
 ester
 40 ml THF
 0,51 g L-Leucyl-L-alanyl-D-threo-
 ninmethylester-trifluor-
 acetat
 0,3 ml Triäthylamin (20% Übersch.)
 30 ml THF

Anhydridsynthese (analog 6).

Es muß sehr sorgfältig mit 5% KHCO₃-Lösung gewaschen werden, da (V) sehr schwer wasserlöslich ist. Nach Abspaltung des t-BOC-Restes zur Reinheitsprüfung zeigte sich im Pherogramm pH 6,5 eine neutrale ninhydrin-positive Substanz, wahrscheinlich (V).

Amorph, leicht gelblich.

Ausbeute (roh): 68%

Analyse:

	C	H	N	S
ber.	58,06%	7,15%	10,09%	6,60%
gef.	58,04%	7,23%	10,17%	6,47%

11. t-BOC-(S-benzyl)-L-cysteiny-L-alanyl-L-prolyl-
(S-benzyl)-L-cysteiny-L-leucyl-L-alanyl-D-threonin
(VII)

(C₄₆H₆₇O₁₁N₇S₂)

(M = 958,23)

0,00083 molarer Ansatz: 800 mg (VI)
1 ml in NaOH
4 ml Dioxan

Verseifung (analog 1.)

Amorph, leicht gelblich

Ausbeute (roh): 88%

12. (S-Benzyl)-L-cysteiny-L-alanyl-L-prolyl-(S-benzyl)-
L-cysteiny-L-leucyl-L-alanyl-D-threonin (VIII)

(C₄₁H₅₉O₈N₇S₂)

(M = 858,11)

0,0005 molarer Ansatz: 480 mg (VII)
1 ml Trifluoressigsäure

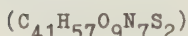
Abspaltung des t-BOC-Restes analog 7.

Reinigung von einer im Pherogramm pH 1,9 schneller laufenden Substanz und Entfernung der Trifluoressigsäure durch saure Elektrophorese (100 mg Rohsubstanz/Karton, 4 1/2 Std.). Die Substanzen werden im UV-Licht identifiziert, ausgeschnitten und mit MeOH eluiert. Der Blankophor des Papiers wird miteluiert, stört aber nicht. Nach dem Abziehen des Lösungsmittels wird die Substanz in abs. Pyridin gelöst und mit abs. Äther ausgefällt. Amorph.

Ausbeute: 51%

13. Cyclo-((S-benzyl)-L-cysteinyl-L-alanyl-L-prolyl-
(S-benzyl)-L-cysteinyl-L-leucyl-L-alanyl-D-threonyl)

(IX)



(M = 840,10)

0,0005 molarer Ansatz: 420 mg (VIII)
3,5 g Äthoxyacetylen (100-facher
600 ml dest. Äthanol Überschuß)

Cyclisierung:

Das freie Peptid wird in der 1000 - 10000-fachen Gewichtsmenge an dest. Äthanol gelöst und mit der 100-fachen Menge an Äthoxyacetylen versetzt.

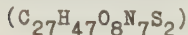
Man erhitzt das Reaktionsgemisch 12 Stunden auf 50°C am Rückfluß und läßt weitere 12 Stunden bei Zimmertemperatur stehen. Nach dem Abdampfen des Lösungsmittels und des überschüssigen Äthoxyacetylen wird die entstandene Neutralsubstanz isoliert.

(IX) wurde durch Elektrophorese bei pH 1,9 auf Karton (100 mg/Karton, 3 Std.) vom offenen Peptid getrennt und mit MeOH eluiert.

Amorphes Pulver.

Ausbeute: 60%

14. Cyclo-(L-cysteinyl-L-alanyl-L-prolyl-L-cysteinyl-L-leucyl-L-alanyl-D-threonyl) (X)



(M = 661,86)

0,00016 molarer Ansatz: 138 mg (IX)
8 mg Na
20 ml NH₃ fl.

Debenzylierung:

Die Benzylverbindung wird in trockenem NH_3 gelöst und Na in kleinen Portionen bis zur bleibenden Blaufärbung zugesetzt. Der Überschuß Na wird mit NH_4Cl zerstört, NH_3 abgedampft, in H_2O aufgenommen, filtriert und mit verdünnter Säure hydrolisiert.

(X) wurde nicht isoliert; sofort weiter umgesetzt.

15. Bicyclo-(L-alanyl(β -yl)-L-alanyl-L-prolyl-L-alanyl(β -yl)-L-leucyl-L-alanyl-D-threonyl)-dimercaptomercuriat (XI)
($\text{C}_{27}\text{H}_{45}\text{O}_8\text{N}_7\text{S}_2\text{Hg}$) (M = 860,46)

(X) wird in kalter 0,5n H_2SO_4 aufgenommen und mit stöchiometrischer Menge saurer HgSO_4 -Lösung versetzt. Es fällt ein weißer, seidiger Niederschlag. Er wird abfiltriert und mit wenig H_2O gewaschen.

Saure HgSO_4 -Lösung: 10 g HgSO_4
2,5 ml 10ⁿ H_2SO_4
2 ml H_2SO_4 konz.
30 ml H_2O

16. Bicyclo-(L-alanyl (β -yl)-L-alanyl-L-prolyl-L-alanyl(β -yl)-L-leucyl-L-alanyl-D-threonyl)-disulfid (XII)
($\text{C}_{27}\text{H}_{45}\text{O}_8\text{N}_7\text{S}_2$) (M = 679,85)

a. aus (XI):

Das Hg-Salz wird zerkleinert, in H_2O suspendiert und H_2S eingeleitet, bis nach 2 Stunden die Suspension völlig schwarz ist. Sie wird abzentrifugiert, mehrmals mit H_2O ausgewaschen, Lösung und Waschwasser vereinigt. Durch Evakuieren wird das H_2S entfernt, die Lösung auf pH 6,5 gebracht und mit H_2O auf ungefähr 1:1000 verdünnt. Die Probe mit Nitroprussid-Na zeigt SH-Gruppen an. Durch eine Fritte wird Luft durch die Lösung gesaugt, wobei unter Schäumen eine weiße Substanz ausfällt. Sie enthält noch freies -SH; die Nitroprussid-Na-positive Komponente läßt sich jedoch mit Methanol extrahieren. Dieser Extrakt wird wieder mit H_2O auf das Verdünnungsverhältnis 1:1000 gebracht und erneut mit Luft oxydiert. Die so erhaltene weiße Substanz ist wahrscheinlich polymer.

Ausbeute etwa 40%

b. aus (X):

Ein Teil des debenzylierten Produktes (X) wird in 1% Essigsäure aufgenommen, mit NH_4OH auf pH 6,5 gebracht und mit H_2O auf 1:1650 verdünnt. (150 mg Substanz/250 ml H_2O). Mittels einer Fritte wird 24 Stunden lang Luft durch die Lösung gesaugt, H_2O abgedampft, getrocknet.

Rohausbeute mit Salzen: 800 mg

Im Exsikkator wurden die begleitenden Salze NH_4 -Acetat und NH_4Cl entfernt (über H_2SO_4 konz. und KOH), auf die Reinigung von NaCl und Na-Acetat, die in geringen Mengen anwesend sein mußten, wurde verzichtet.

Das entstandene Produkt war mit großer Sicherheit monomer. Amorph, leicht gelblich.

Ausbeute nicht bestimmt.

17. Bicyclo-(L-alanyl(β -yl)L-alanyl-L-prolyl-L-alanyl
(β -yl)L-leucyl-L-alanyl-D-threonyl)-formaldehyd-
dimercaptal (XIII)
 $(C_{28}H_{47}O_8N_7S_2)$ (M = 673,87)

Eine Probe des monomeren Disulfids (XII) wird in fl. NH_3 im Verhältnis 1:1000 gelöst und mit Na reduziert bis zur bleibenden Blaufärbung. Mit NH_4Cl entfärbt, daraufhin mit etwa der stöchiometrischen Menge CH_2Cl_2 versetzt und langsam abdampfen gelassen. Gleiche Aufarbeitung wie bei (XII).

18. t-BOC-(S-benzyl)-L-cysteinthiophenylester
 $(C_{21}H_{25}O_3NS_2)$ (M = 403,57)

0,0435 molarer Ansatz: 13,5 g t-BOC-(S-benzyl)-L-cystein
 (roh)
 6,18 ml Triäthylamin
 4,13 ml Chlorameisensäureäthylester
 200 ml THF
 2,8 ml Thiophenol

Anhydridsynthese (analog 4. und 6.)

Die Substanz kristallisiert leicht und kann aus Isopropanol umkristallisiert werden. Es wird jedoch darauf verzichtet, da keinerlei Reinigungseffekt eintritt. Die Substanz ist von der ihr anhaftenden Schmiere ebenso wenig zu befreien, wie das rohe, kristalline, aber gelbbraune t-BOC-(S-benzyl)-L-cystein, das in die Synthese eingesetzt worden ist.

Ausbeute (roh): 52%

19. L-Prolinmethylester-hydrochlorid



(M = 165,63)

0,18 molarer Ansatz:

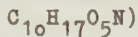
20,7 g L-Prolin
120 ml MeOH abs.
25,5 ml SOCl_2

Veresterung, SOCl_2 -Methode:

Das MeOH wird im Eis/NaCl-Bad auf -15°C gekühlt und das SOCl_2 vorsichtig einpipettiert, wobei man, um Spritzen zu vermeiden, das Säurechlorid zweckmäßig an der Kolbenwand hinunterlaufen läßt. Man trägt die Aminosäure ein, erhitzt das Gemisch 4 Stunden auf 45°C und läßt noch 16 Stunden bei 20°C stehen. Man zieht i.V. ab und trocknet über KOH. Oft gelingt die Umkristallisation aus wenig abs. Methanol/abs. Äther.

Leicht gelbliches Öl, das noch HCl und Lösungsmittel festhält und bei längerem Stehen violett wird.
Ausbeute nicht festzustellen.

20. t-BOC-L-hydroxyprolin



(M = 231,25)

0,025 molarer Ansatz:

3,28 g L-Hydroxyprolin
2,00 g MgO (92% Überschuß)
6,90 g t-BOC-Azid (92% Überschuß)
40 ml H_2O
90 ml Dioxan (KOH dest.)

Acylierung analog 3.

Vor dem Ansäuern mit fester Citronensäure wird die Lösung mit NaCl gesättigt, der ausgeschiedene restliche Essigester abgetrennt und verworfen.

Die salzgesättigte saure Lösung wird 5 mal mit Essigester ausgezogen. Weiteres Auestern erhöht die Ausbeute nicht.

Pherographisch sauber.

Beim Stehen kristallisiert das rohe Öl durch. Die Kristalle werden abgepresst, mit absolutem Äther gewaschen. Weiße Kristalle.

Fp.: 123° (Zers.)

Ausbeute: 70%

Analyse:

C	H
ber. 51,94%	7,41%
gef. 51,96%	7,45%

21. Obo-L-Tryptophan

($C_{19}H_{18}O_4N_2$)

(M = 338,37)

0,2 molarer Ansatz: 40,8 g L-Tryptophan
100 ml 2n NaOH
34,1 g Obo-Chlorid
100 ml 2n NaOH

Cbo-Aminosäure:

In die wäßrige, eisgekühlte Lösung des Na-Salzes der Aminosäure tropft man unter Vibrieren äquivalente Mengen Säurechlorid und Natronlauge ein. Man läßt noch einige Zeit bei Raumtemperatur reagieren, äthert dann einmal aus und fällt die acylierte Aminosäure mit 6n HCl. Abfiltrieren oder Auestern je nach Konsistenz.

Das Cbo-Tryptophan wird abgesaugt, 2 x mit H₂O aufgeschlämmt und scharf getrocknet.

Umkristallisiert aus Essigester/Petroläther 30/80

Nur chromatographisch reines, weißes Tryptophan liefert weißes Cbo-Tryptophan. Gelbliche oder graue Verunreinigungen des Tryptophans haften auch am acylierten Produkt und sind auch durch wiederholtes Umkristallisieren aus Essigester/Petroläther nicht zu entfernen.

Fp.: 116 - 124°

Ausbeute: 66 - 77%

22. D,L-Hydroxyleucinamid-hydrochlorid



(M = 182,66)

o,15 molarer Ansatz: 25 g D,L-Hydroxyleucinlacton-
hydrochlorid
1250 ml dest. Methanol

Das Methanol wird bei -20°C mit trockenem NH₃ gesättigt. Die Aminosäure wird in 5 Bierflaschen verteilt, mit dem

Methanol übergossen, verschlossen und über Nacht stehen gelassen. Am nächsten Tag wird die Lösung nochmals bei -20°C mit NH_3 gesättigt, nach weiteren 24 Stunden ein drittes Mal. Nach dem Abziehen des NH_3 und des Methanols hinterbleibt ein bräunliches Öl, das aus heißem Isopropanol/abs. Äther weiße Kristalle liefert.

Fp.: $>200^{\circ}$, Braunfärbung, bei 138° Sintern unter Abgabe von Kristallwasser

Ausbeute: 68%

23. Cbo-L-tryptophyl-D,L-hydroxyleucinamid (XIV)

($\text{C}_{25}\text{H}_{30}\text{O}_5\text{N}_4$)

(M = 466,55)

0,044 molarer Ansatz: 14,9 g Cbo-L-tryptophan
6,3 ml Triäthylamin
4,2 ml Chlorameisensäureäthylester
150 ml THF
8 g D,L-Hydroxyleucinamid-hydrochlorid
6,3 ml Triäthylamin
40 ml THF
etwas H_2O

Anhydridsynthese analog 6.

Cbo-L-tryptophan ist in 5% KHCO_3 -Lösung nur schwer löslich. Es muß daher sehr oft basisch gewaschen werden. Durchschnittlich war der Ansatz nach dem 16. - 19. basischen Ausschütteln frei von Cbo-Tryptophan.

Die Substanz ist chromatographisch einheitlich, abgesehen von etwas Cbo-L-tryptophyl-D,L-hydroxyleucinlac-

ton, das auch durch häufiges Waschen mit 5% KHCO_3 nicht entfernt werden kann.

Amorph, roh weiterverarbeitet.

Ausbeute (roh): 83%

24. L-Tryptophyl-D,L-hydroxyleucinamid (XV)

($\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{O}_3\text{N}_4$)

(M = 332,41)

0,075 molarer Ansatz: 35 g XIV
 250 ml dest. MeOH
 ca. 5 g Pd-Mohr

Katalytische Hydrierung:

Das Cbo-geschützte Peptid wird in abs. Methanol gelöst; ca. $\frac{1}{10}$ - $\frac{1}{2}$ der Peptidmenge an Pd-Mohr wird mit abs. Methanol durch Dekantieren H_2O -frei gewaschen und zugefügt. Nachdem man kurze Zeit mit N_2 gespült hat, vibriert man ca. 2 Stunden, wobei ein schwacher Strom H_2 durch die hohle Vibrationsstange eingeleitet wird. Das Ende der Reaktion sollte pherographisch geprüft werden. Man filtriert durch ein feines Filter und zieht das Lösungsmittel i.V. ab.

Öl. Roh weiterverarbeitet.

Ausbeute (roh): 94%

25. Cbo-L-alanyl-L-tryptophyl-D,L-hydroxyleucinamid (XVI)
($C_{28}H_{35}O_6N_5$) (M = 537,63)

0,020 molarer Ansatz: 4,91 g Cbo-L-alanin (10% Übersch.)
3,15 ml Triäthylamin
2,09 ml Chlorameisensäureäthylester
100 ml THF
6,64 g (XV)
3,2 ml Triäthylamin
40 ml THF
einige Tropfen H_2O

Anhydridsynthese analog 6.

Die Aufarbeitung verläuft bisweilen unregelmäßig, da (XVI) nur in H_2O -gesättigtem Essigester löslich ist.

Sinkt der H_2O -Gehalt des Essigesters, sei es durch Zusatz von NaCl zum emulgierten Verteilungsgleichgewicht H_2O /Essigester, oder beim Trocknen des Essigesters mit $MgSO_4$, fällt das Tripeptid kristallin und chromatographisch rein aus.

Umkristallisiert aus feuchtem Essigester/trockenem Essigester. Vom $MgSO_4$ durch mehrmaliges Aufschlännen mit H_2O befreit, getrocknet.

Fp.: 192-195°

Ausbeute: 49%

26. L-Alanyl-L-tryptophyl-D,L-hydroxyleucinamid (XVII)
($C_{20}H_{29}O_4N_5$) (M = 403,49)

0,0085 molarer Ansatz: 4,6 g (XVI)
80 ml dest. Methanol
ca. 1 g Pd-Mohr

Hydrierung analog 24.

Kristallin aus wenig heißem Äthanol/Essigester

Fp.: 182°, (Zers.)

Ausbeute: 69%

27. t-BOC-L-hydroxypropyl-L-alanyl-L-tryptophyl-D,L-
hydroxyleucinamid (XVIII)
(C₃₀H₄₄O₈N₆) (M = 626,73)

0,0093 molarer Ansatz: 2,37 g t-BOC-hydroxyprolin (10% Überschuß)
1,45 ml Triäthylamin
9,63 ml Chlorameisensäureäthylester
80 ml THF
3,74 g (XVII) in wenig H₂O

Anhydridsynthese analog 6.

Da (XVIII) sehr schlecht in Essigester, aber gut in H₂O löslich ist, muß die Aufarbeitung modifiziert werden. (XVIII) wird in 100 ml H₂O gelöst (unter Zusatz von etwas Methanol) und 2 mal mit je 25 ml aufgeschlammtem Ionenaustauscher Dowex-50(H⁺-Form, 200-400 mesh) gewaschen, 8 mal mit je 12 ml Dowex-1 (OH⁻-Form, 200-400 mesh). Aus heißem Essigester umkristallisiert. Geringe Mengen t-BOC-L-hydroxypropyl-L-alanyl-L-tryptophyl-D,L-hydroxyleucinlacton können so nicht entfernt werden.
Fp.: 153° (unter Sintern und Zersetzen)
Ausbeute: 59%

28. L-Hydroxypropyl-L-alanyl-L-tryptophyl-D,L-hydroxy-
leucinlacton-trifluoracetat (XIX)

(C₂₇H₃₄O₈N₅F₃)

(M = 613,61)

BOC-Abspaltung analog 7. Zusatz von 4 ml H₂O

I.V. über KOH getrocknet.

Kristallin aus heißem Isopropanol.

Fp.: 210-213°, (Zersetzung und Braunfärbung)

Auch nach dem dritten Umkristallisieren enthält die Substanz noch mindestens 5 tryptophanhaltige Komponenten in sehr geringer Konzentration.

Ausbeute: 82%

29. Cbo-L-hydroxyprolin (38)

(C₁₃H₁₅O₅N)

(M = 265,27)

0,1 molarer Ansatz: 13,1 g L-Hydroxyprolin
180 ml 4n NaOH
22,0 ml Cbo-Cl

Die Darstellung des Cbo-L-hydroxyprolins weicht von dem üblichen Verfahren ab. Die Aminosäure wird in der Natronlauge gelöst und auf -15° gekühlt. Unter Vibrieren tropft man das Cbo-Cl langsam zu und läßt noch 1 Stunde bei -5° reagieren. Man extrahiert mit Äther und säuert die wäßrige Phase bei 0° mit 6n HCl an. Kochsalzgesättigt erhält man ein Öl, das mit Essigester extrahiert wird. Nach dem Waschen der org. Phase mit Kochsalzlösung, wird

über MgSO_4 getrocknet, das Lösungsmittel i.V. abgezogen. Das farblose Öl kristallisiert durch. Umkristallisiert aus Essigester/Petroläther.

Fp.: $108-109^\circ$

Ausbeute: 69%

30. L-Alaninmethylester-hydrochlorid

$(\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2\text{NCl})$

(M = 139,59)

0,18 molarer Ansatz: 16 g L-Alanin
120 ml abs. Methanol
25,5 ml SOCl_2

Veresterung analog 19.

Fp.: nicht bestimmt

Ausbeute: 84%

31. Cbo-L-hydroxypropyl-L-alaninmethylester (XX) (38)

$(\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{O}_6\text{N}_2)$

(M = 350,38)

0,05 molarer Ansatz: 13,3 g Cbo-L-hydroxyprolin
7,1 ml Triäthylamin
4,75 ml Chlorameisensäureäthylester
150 ml THF abs.
7,0 g L-Alaninmethylester-hydrochlorid
10,0 ml Triäthylamin
20 ml H_2O

Anhydridsynthese analog 6. Weiße Kristalle.

Fp.: 110°

Ausbeute: 72%

32. Cbo-L-hydroxypropyl-L-alaninhydrazid (XXI) (38)
(C₁₆H₂₂O₅N₄) (M = 350,38)

0,031 molarer Ansatz: 10,9 g (XXI)
15 ml abs. Äthanol
1,9 ml 100% Hydrazinhydrat

Der Dipeptidester wird unter Erwärmen in abs. Alkohol gelöst, mit dem Hydrazinhydrat versetzt und über Nacht stehengelassen. Am nächsten Tag fällt man mit abs. Äther, saugt die gallertige Masse ab, wäscht mit abs. Äther und kristallisiert aus abs. Methanol/Essigester/Petrol-äther 30/80 um.

Fp.: 162-163°

Ausbeute 68%

33. Cbo-L-hydroxypropyl-L-alanyl-L-tryptophyl-D,L-hydroxyleucinamid (XXII)
(C₅₃H₄₂O₈N₆) (M = 650,75)

0,006 molarer Ansatz: 2,1 g (XXI)
28 ml 1n HCl, (NaCl ges.)
6 ml 1n NaNO₂-Lösung (0°C)
70 ml Essigester (0°C)
2,0 g (XV)
23 ml getrocknetes DMF.

Azidsynthese:

Das Hydrazid wird in der NaCl ges. 1n HCl gelöst und im Eisbad auf 0°C gekühlt. Unter Vibrieren tropft man

die ebenfalls gekühlte Nitritlösung zu, wobei das Azid sofort klebrig ausfällt. Man läßt noch 2-3 Minuten reagieren, fügt - auch unter Vibrieren - den ebenfalls auf 0°C gekühlten Essigester zu und trennt die wäßrige Phase ab. Man wäscht 2 mal mit NaCl-ges. Wasser (0°C), 1 mal mit ges. KHCO_3 -Lösung, noch 1 mal mit NaCl-ges. Wasser (0°C) und trocknet die Azidlösung mit MgSO_4 ca. $\frac{1}{2}$ Stunde unter gelegentlichem Umschütteln im Eisschrank.

Die Aminokomponente wird in Essigester oder CHCl_3 gelöst und gekühlt. Man vereinigt diese Lösung mit der filtrierten Lösung des Azids und hält das Reaktionsgemisch 1 Tag bei 0°C, einen weiteren Tag bei Zimmertemperatur.

Die Aufarbeitung erfolgt durch Waschen der Essigesterlösung mit 1n Säure, Wasser, 5% KHCO_3 -Lösung und Wasser. (analog 6.).

Da (XV) in Essigester oder CHCl_3 unlöslich ist, wird es in Dimethylformamid gelöst und zugefügt. Auch die Aufarbeitung wird modifiziert.

Nach dem Abziehen des Essigesters und des größten Teiles des DMF i.V. bei 40° wird das rohe Peptidgemisch mit abs. Äther durchgearbeitet. Man erhält ein gelbliches Pulver. In einem 250 ml Erlenmeyer wird das rohe Produkt in wenigen ml Methanol gelöst und mit Wasser auf ca. 100 ml aufgefüllt. Unter magnetischem Rühren wird 3 mal je 8 Minuten lang mit 3,5 g feuchtem Dowex 50 (H^+ , 200-400 mesh), 2 mal je 15 Minuten lang mit 3,5 g feuchtem Dowex 1 (OH^- , 200-400mesh) gewaschen.

Nach dem Abziehen des Lösungsmittels hinterbleibt ein weißes, amorphes Pulver, das chromatographisch rein ist.
Ausbeute: 48-62%

34. L-Hydroxypropyl-L-alanyl-L-tryptophyl-D,L-hydroxy-
leucinamid-trifluoracetat (XXIII)
($C_{27}H_{37}O_8N_6F_3$) (M = 630,64)

0,0037 molarer Ansatz: 2,4 g (XXII), Pd-Mohr
0,4 ml Trifluoressigsäure
(30% Überschuß)

Katalytische Hydrierung analog 25.

Nach der Hydrierung wird das Methanol bis auf wenige ml abgezogen, die Trifluoressigsäure zugesetzt und das Salz mit abs. Äther ausgefällt. Noch einige Male mit abs. Äther durchgearbeitet, um letzte Reste freie Säure zu entfernen.

Weiß, amorph, verunreinigt durch etwas (XIX)
Ausbeute (roh): 90%

35. t-BOC-D-threonin
($C_9H_{17}O_5N$) (M = 219,24)

0,1 molarer Ansatz: 11,9 g D-Threonin
8 g MgO (100% Überschuß)
28,5 g t-BOC-azid (100% Überschuß)
130 ml H_2O
270 ml Dfoxan (KOH dest.)

Acylierung analog 3.

Nach dem Ansäuern wird mit NaCl gesättigt und 5 mal mit Essigester ausgezogen. Über $MgSO_4$ getrocknet, wird das Lösungsmittel weitgehend i.V. abgezogen. Das zurückbleibende Öl enthält noch 12-31% Essigester, die sich auf diesem Weg nicht mehr entfernen lassen. Für die folgende Synthese wird der Gehalt an BOC-D-threonin durch Titration mit $n/10$ NaOH gegen Phenolphthalein bestimmt. Ausbeute: 76%

36. t-BOC-D-threonyl-(S-benzyl)-L-cysteinmethylester(XXIV)
($C_{20}H_{30}O_6N_2S$) (M = 426,54)

0,035 molarer Ansatz: 11 g t-BOC-D-threonin (Gehalt 69%)
5 ml Triäthylamin
3,34 ml Chlorameisensäureäthylester
160 ml THF abs.
10 g (S-Benzyl)-L-cysteinmethylester-
hydrochlorid (10% Überschuss)
5,6 ml Triäthylamin
20 ml THF abs.
20 ml H_2O

Anhydridsynthese analog 6.

Kristallisiert roh durch.

Fp.: 77°

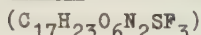
Ausbeute: 58%

weitere 8% sind nur als Öl zu gewinnen.

Analyse:

	C	H
ber.	56,32%	7,09%
gef.	56,09%	7,06%

37. D-Threonyl-(S-benzyl)-L-cysteinmethylester-trifluoracetat (XXV)



(M = 440,45)

0,0187 molarer Ansatz: 8 g (XXIV)
20 ml Trifluoressigsäure

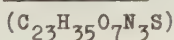
BOC-Abspaltung analog 7.

Gelbliches Öl, das noch Trifluoressigsäure festhält.

Ausbeute nicht bestimmt.

Roh umgesetzt.

38. t-BOC-L-alanyl-D-threonyl-(S-benzyl)-L-cysteinmethylester (XXVI)



(M = 497,62)

0,0187 molarer Ansatz: 3,9 g BOC-L-alanin (10% Überschuß)
2,9 ml Triäthylamin (10% Überschuß)
1,95 ml Chlorameisensäureäthylester
120 ml THF abs.
(XXV) roh aus 37.
7 ml Triäthylamin
30 ml THF
10 ml H₂O

Anhydridsynthese analog 6.

Vor der Zugabe der Aminokomponente wird wegen der unbestimmten Konzentration an freier Säure der pH-Wert geprüft. Er war > 7. Weiße Kristalle.

Fp.: 144°

Ausbeute: 75%

39. t-BOC-L-alanyl-D-threonyl-(S-benzyl)-L-cystein (XXVII)
($C_{22}H_{33}O_7N_3S$) (M = 483,60)

0,0316 molarer Ansatz: 15,75 g (XXVI)
35 ml 1n NaOH
100 ml Dioxan (KOH dest.)
200 ml H_2O

Verseifung analog 1.

Nach dem Ansäuern mit Citronensäure fällt die Peptid-
säure ölig aus, kann aber durch Anampfen und halbstün-
diges Schütteln kristallin erhalten werden.

Fp.: 171°

Ausbeute: 79%

40. t-BOC-L-alanyl-D-threonyl-L-cystein (XXVIII)
($C_{15}H_{27}O_7N_3S$) (M = 393,47)

0,003 molarer Ansatz: 1,5 g (XXVII)
50 ml NH_3 fl.
Na

Debenzylierung analog 14.

Mit einem Überschuß Citronensäure hydrolysiert, mit
NaCl gesättigt und 4 mal mit Essigester extrahiert.
3 mal mit NaCl gesättigtem H_2O gewaschen, über $MgSO_4$
getrocknet und Lösungsmittel abgezogen.

Ausbeute (roh): 85%

Beim Übergießen mit Chloroform oder Essigester spontane Kristallisation.

Fp.: 127° (Zersetzung, trockenes Gasen)

Ausbeute (krist.): 73% (aus Essigester)

81% (aus Chloroform)

Analyse:

aus Essigester:

	C	H	N	S	O	Cl
ber.	45,79%	6,92%	10,68%	8,15%	---	---
gef.	45,66%	7,01%	10,57%	8,12%	---	---

aus Chloroform:

gef. 39,70% 6,14% 7,72% 5,78% 22,09% 14,47%

Die Summe der Prozentzahlen aller Direktbestimmungen der aus Chloroform umkristallisierten Substanz ergibt: 95%. Es handelte sich jedoch um 2 unterschiedlich getrocknete Analysenproben.

41. (L-Hydroxypropyl-L-alanyl-L-tryptophyl(ind-2-yl)-D,L-hydroxyleucinlacton)-(t-boc-L-alanyl-D-threonyl-L-alanin(β-yl))-sulfid (XXIX)

(C₄₀H₆₁O₁₃N₉S)

(M = 908,06)

0,0004 molarer Ansatz: 180 mg N-Chlorsuccinimid (NCS)
(0,00135 Mol)
(236% Überschuss) in

4 ml Chloroform abs. und
1,5 ml THF abs.

472 mg (XXVII) (0,0012 Mol)
(200% Überschuß) in
6 ml THF abs.

254 mg (XXIII) (0,0004 Mol) in
6 ml Dimethylformamid abs. und
4 ml Chloroform abs.

Als Reaktionsgefäß dient ein 100 ml-4-Halskolben mit KPG-Rührer, Tropftrichter (mit CaCl_2 -Rohr verschlossen) CaCl -Rohr und N_2 -Einleitungsrohr. Der Stickstoffstrom (N_2 -reinst) wird in einer alkalischen Dithionitlösung (48 g Na-dithionit in 150 ml H_2O + 40 g NaOH und 12 g Anthrachinon- β -sulfonat in 150 ml H_2O) von O_2 befreit und anschließend in H_2SO_4 getrocknet.

Reaktion: Die Suspension des N-Chlorsuccinimid (NCS) wird vorgelegt und unter Rühren und N_2 -Spülung ca. 15 Minuten bei -20°C (Eis/ NaCl -Bad) gekühlt. Man läßt nun die Lösung des Tripeptids zügig zutropfen und rührt bei -20°C weitere 60-70 Minuten. Dabei färbt sich die Lösung meist gelb. Das NCS geht in Lösung.

Durch den gleichen Tropftrichter wird die gekühlte Lösung des Tetrapeptids zugegeben, wobei man zweckmäßig zunächst einige Tropfen Dimethylformamid in den Tropftrichter füllt, um zu verhindern, daß an der Glaswand hängendes THF Tetrapeptid zum Ausflocken bringt. Die tryptophanhaltige Komponente wird in einem Zuge hineingegeben. Man läßt noch 1 Stunde unter Kühlung reagieren, wobei sich das Kältebad erwärmt. Weitere 40-60 Minuten sollte die Reaktion noch bei Zimmertemperatur laufen.

Zur **I s o l i e r u n g** läßt man ca. 80 ml abs. Äther zutropfen, wobei aus der roten Lösung eine hellrote Schmiere ausfällt, die durch mehrmaliges Durcharbeiten im Zentrifugenglas mit trockenem Äther pulvrig erhalten wird. (ca. 400 mg) Thioätheranteil: ca. 30% (geschätzt).

Zur **R e i n i g u n g** dient eine Sephadex Säule (Länge 120 cm, Durchmesser 4 cm, Seph.G-25 mittel) mit H_2O als Fließmittel, auf der jeweils 250 mg Rohsubstanz auf einen Gehalt von schätzungsweise 80% (XXIX)-tri-fluoracetat angereichert werden.

Zur **F r e i s e t z u n g** und **w e i t e r e n R e i n i g u n g** werden die gesammelten, vorgereinigten Fraktionen auf einer größeren Sephadex-Säule gestartet. (Länge 200 cm, Durchmesser 4 cm, Sephadex G-25 mittel), ebenfalls mit H_2O als Fließmittel. Startmenge: 300 mg unter Zusatz von 3 ml $N/10$ -Triäthylaminlösung (1,42 ml Triäthylamin in 100 ml H_2O)
Weißes, amorphes Pulver, ca. 95% (XXIX)
Ausbeute: 26% (101 mg)

42. Cyclo-(t-boc-L-alanyl-D-threonyl-L-alanyl(8-yl)-L-hydroxyprolyl-L-alanyl-L-tryptophyl(ind-2-yl)-D,L-hydroxyleucinlacton)-sulfid (XXX)
($C_{40}H_{59}O_{12}S$) (M = 890,04)

0,00044 molarer Ansatz: 400mg (XXIX)
7 ml Äthoxyacetylen (0,079 Mol)
(175-facher Überschuß)
200 ml Methanol (Na-dest.)
800 ml Äthanol (Na-dest.)

Das Peptid wird in Methanol unter Erwärmen gelöst. Nach Zusatz des Äthanol und des Äthoxyacetyls wird das Gemisch 36 Stunden am Rückfluß auf 55°C erhitzt. Nach dem Abziehen des Lösungsmittels wird der Monocyclus auf einer Kieselgelsäule (Länge 120 cm, Durchmesser 4 cm, Kieselgel 0,05-0,2 mm) mit Essigester/abs. Methanol 1/1 als Fließmittel vom offenen Peptid getrennt.

Weißes, amorphes Pulver, chromatographisch rein.

Ausbeute: 54%

43. Cyclo-(L-alanyl-D-threonyl-L-alanyl(β-yl)-L-hydroxyprolyl-L-alanyl-L-tryptophyl(ind-2-yl)-D,L-hydroxyleucinlacton-trifluoracetat)-sulfid

bzw.

⁴L-Hypro-⁷D,L-Hyleu-Secophalloin-trifluoracetat (XXXI)

(C₃₇H₄₉O₁₂N₈SF₃)

(M = 886,93)

Zur pherographischen und chromatographischen Identifizierung wurde eine Probe (XXX) mit Trifluoressigsäure der BOC-Abspaltung unterworfen.

Das pherographisch und chromatographisch nahezu reine Produkt wurde nicht isoliert.

44. Cho-D,L-hydroxyloucinlacton

($C_{14}H_{17}O_4N$)

(M = 263,30)

0,072 molarer Ansatz: 12 g D,L-Hydroxyloucinylsuccinylchlorid
144 ml 1n NaOH
12,5 g Carbobenzoxylchlorid
72 ml 1n NaOH

Carbobenzoxylisierung analog 21.

Die Lösung der Aminosäure in NaOH wird vor der eigentlichen Reaktion bei 6°C 30 Minuten bei Zimmertemperatur vortiert, um die Öffnung des Lactons zu gewährleisten.

Cho-hydroxyloucin fällt zunächst ölig an, lässt sich aber nach Anheben und 1/2-stündigen Schütteln als kristallines Cho-hydroxyloucinlacton durch Filtration isolieren.

Sp.: 93°

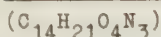
Ausbeute: 85%

45. Acetat des γ -BVL-L-alanyl-D-hydroxy-L-(3-benzyl)-L-cysteins (XXVII) mit Carboxypeptidase

a. Vorbereitung der Acetyl-Lösung. (39). 0,1 ml wässrige Suspension von kristalliner Carboxypeptidase wurde bei 6°C unter Maximaltemperatur in 0,3 ml 10% LiCl-Lösung gesetzt (ca. 1 Stunde), dann in der Tiefkühltruhe (-18°C) eingefroren und dort aufbewahrt.

b. Reaktion. 3,5 mg (XXVII) wurden in 0,26 ml Veronalpuffer (pH 8,6) gelöst und mit 0,4 ml der Enzymlösung inkubiert. Das Reaktionsgemisch wurde 4 Stunden bei 40°C belassen, das Wasser abgezogen, der Rückstand in etwas Methanol/ Wasser aufgenommen, sodann pherographisch (pH 1,9 und pH 6,5 Ninhydrin und Chlor) und dünn-schichtchromatographisch (Kieselgel G/Meth./Chlorof./ 1/1/Ninhydrin und Chlor) identifiziert.

46. Cbo-D,L-hydroxyleucinhydrazid



(M = 295,35)

0,020 molarer Ansatz: 5,4 g Cbo-D,L-hydroxyleucinlacton
1,2 ml 100% Hydrazinhydrat
1,2 ml abs. Äthanol

Das Lacton wird unter Erwärmen in Alkohol gelöst, mit dem Hydrazinhydrat versetzt und 40 Stunden stehen gelassen. Das nach dem Entfernen des Alkohols i.V. zurückbleibende Öl kristallisiert beim Stehen durch und ist dünn-schichtchromatographisch rein.

Fp.: nicht bestimmt

Ausbeute: 100%

47. Cbo-D,L-hydroxyleucinamid



(M = 280,33)

0,0069 molarer Ansatz: 1,8 g Cbo-D,L-hydroxyleucinlacton
200 ml abs. Methanol

Das Lacton wird im Methanol gelöst, auf -20°C gekühlt, mit trockenem NH_3 gesättigt und in einer Bierflasche bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Nach 24 Stunden wird das Verfahren wiederholt und nochmals 48 Stunden stehen gelassen. Nach dem Abziehen des Lösungsmittels hinterbleibt das ölige Cbo-hydroxyleucinamid, das noch $<1\%$ Cbo-hydroxyleucinlacton enthielt und beim Stehen durchkristallisiert. Umkristallisiert aus heißem Essigester/Petroläther 30/80.

Fp.: 113°C (Sintern ab 105°C)

Ausbeute: 78%

48. Cbo-(O-tetrahydropyryl)-D,L-hydroxyleucinamid (40)
($\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{O}_5\text{N}_2$) (M = 364,45)

0,005 molarer Ansatz: 1,4 g Cbo-D,L-hydroxyleucinamid
1,1 ml 2,3-Dihydropyran +)
0,06 ml HCl-gesättigter Essigester (ca. 3n)

Die Kristalle des Amids werden im Dihydropyran angeleigt, mit der Säure versetzt und 3 Tage unter gelegentlichem Umschütteln stehen gelassen. Die Kristalle gehen langsam in Lösung, wobei sich einige neue Kristalle bilden. In abs. Äther aufgenommen, kann von den

⁺) Das rohe 2,3-Dihydropyran der Firma EGA-Chemie KG wurde zunächst einer Reinigung unterzogen: 48 Stunden über KOH stehen gelassen, von der roten Schmiere abdekantiert, destilliert. (Kp: $85-87^{\circ}\text{C}$). Ein verhältnismäßig großer Vorlauf neigt zur Kristallisation.
Ausbeute 67 g klares Öl aus 100 g rohem Produkt.

neugebildeten Kristallen (Cbo-D,L-hydrocyleucinlacton) abdekantiert werden. Der Äther wird kurz mit wenig H_2O , dann mit Na_2CO_3 -Lösung und wieder mit H_2O gewaschen, über $MgSO_4$ getrocknet und abgezogen.

Dünnschichtchromatographisch rein.

Öl.

Ausbeute: ca. 80%

49. L-Alaninmethylester

$(C_4H_9O_2N)$

$(M = 103,12)$

0,1 molarer Ansatz: 14 g L-Alaninmethylesterhydrochlorid

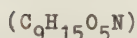
Das L-Alaninmethylesterhydrochlorid wird portionsweise in einem Schütteltrichter mit kaltem Äther überschichtet und mit kalter 10%-Natronlauge neutralisiert. Der Äther wird abgetrennt, neuer Äther hinzugegeben, mit kalter 10%-Natronlauge alkalisch gemacht und der Äther erneut abgetrennt. Noch 2 mal ausgeäthert; die gesammelten Ätherfraktionen werden in der Tiefkühltruhe über $MgSO_4$ getrocknet und das Lösungsmittel bei $35^\circ C$ langsam abdestilliert (ohne Vakuum!). Es hinterbleibt ein leicht gelbes Öl. Roh weiterverarbeitet.

Ausbeute: 39%

50. Acetaminomalonester

Nach einer Vorschrift von H.R. Snyder u. Mitarbeitern

(41,42)



(M = 217,23)

1 molarer Ansatz: 160 g Malonester
180 g Eisessig
208 g NaNO_2 in
285 ml H_2O^2

Der Malonester wird in einem 11-3-Halskolben im Eisessig gelöst, auf 0°C gekühlt und NaNO_2 -Lösung im Verlauf 1 Stunde unter Rühren zugetropft, wobei die Temperatur unter 20°C gehalten wird. Nach Zugabe der Nitritlösung wird noch 4 Stunden bei Zimmertemperatur gerührt; 3 mal mit je 200 ml Äther extrahiert, werden die vereinigten Ätherauszüge 3 mal mit 100 ml 10% Sodalösung und 2 mal mit 100 ml H_2O gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und der Äther i.V. abgezogen. Öl, roh weiterverarbeitet.

Ausbeute: 86% (163g)

0,86 molarer Ansatz: 163 g Nitrosomalonester
500 ml Eisessig
490 ml Essigsäureanhydrid
180 g Zinkstaub

Die Nitrosoverbindung wird im Eisessig gelöst und das Anhydrid zugesetzt. Unter kräftigem Rühren wird das Zink so zugegeben, daß die Temperatur zwischen 20 - 30°C blieb. Nach Zugabe des Zinks wird noch 2 Stunden gerührt, dann

wurde abfiltriert. Das Filtrat wird zur Trockne eingeeengt und der Rückstand aus möglichst wenig Isopropanol umkristallisiert.

Fp.: 94°

Ausbeute: 52% (97g)

51. β-Methylallyl-acetaminomalonester

(C₁₃H₂₁O₅N)

(M = 271,32)

0,1 molarer Ansatz: 21,7 g Acetaminomalonester
2,3 g Na
200 ml abs. Äthanol
11,8 g β-Methylallylchlorid

Der Acetaminomalonester wird in Alkohol gelöst und das Na zugegeben. In die kochende Lösung wird das Methylallylchlorid zugegossen und der Ansatz noch 6 Stunden am Rückfluß gekocht.

Nach dem Abziehen des Lösungsmittels i.V. wird der Rückstand in 50 ml Chloroform und 50 ml Wasser aufgenommen, abgetrennt, die wäßrige Phase noch einige Male mit Chloroform extrahiert. Der Rückstand der Chloroformextrakte wird aus Benzol/Ligroin umkristallisiert.

Fp.: 90°

Ausbeute: 68%

52. γ-Hydroxyleucinlacton-hydrochlorid

($C_6H_{12}O_2NCl$)

(M = 165,63)

0,074 molarer Ansatz: 20 g β-Methylallylacetaminomalon-
ester
200 ml 6n HCl

Zur Verseifung und Decarboxylierung wird der Methylallylacetaminomalonester 4 Stunden in der halbkonzentrierten Salzsäure am Rückfluß gekocht. Nach dem Abziehen der Säure i.V. wird in wenig heißem Alkohol aufgenommen, wobei man zweckmäßig den Rückstand mit Alkohol am Rückfluß auskocht.

Beim Abkühlen Kristalle.

Fp.: 207-209°

Ausbeute: 75%

E. Literaturverzeichnis

- | | | |
|----|---|---|
| 1 | Th. Wieland | Helv. chim. Acta <u>44</u> , 919 (1961) |
| 2 | Th. Wieland, H. W. Schnabel | Liebigs Ann. Chem. <u>657</u> , 225 (1962) |
| 3 | Th. Wieland, O. Wieland | Pharmacol. Reviews <u>11</u> , 87 (1959) |
| 4 | A. G. van Veen, A. J. Hyman | Geneesk. Tijdsch. Nederl. -
Indie <u>73</u> , 991 (1933) |
| 5 | M. S. Armstrong, V. du Vigneaud | J. biol. Chemistry <u>168</u> , 373 (1947) |
| 6 | H. Faulstich | Diplomarbeit Frankfurt/M. (1961) |
| 7 | D. Ben-Ishai, A. Berger | J. org. Chemistry <u>17</u> , 1564 (1952) |
| 8 | N. P. Albertson, F. C. McKay | J. Amer. chem. Soc. <u>79</u> , 4686 (1957) |
| 9 | R. Schwyzer, P. Sieber
H. Kappeler | Helv. chim. Acta <u>42</u> , 2622 (1959) |
| 10 | Th. Wieland, H. Bernhard | Liebigs Ann. Chem. <u>572</u> , 190 (1951) |
| 11 | R. A. Boissonas | Helv. chim. Acta <u>34</u> , 874 (1951) |
| 12 | J. R. Vaughan, R. L. Osafo | J. Amer. chem. Sa. <u>73</u> , 3547 (1951) |
| 13 | V. du Vigneaud | J. biol. Chemistry <u>130</u> , 110 (1939) |
| 14 | R. A. Boissonas, St. Cuttmann,
P. A. Jaquenoud, J. P. Waller | Helv. chim. Acta <u>38</u> , 1491 (1955) |
| 15 | H. Schwarz, F. M. Bumpus,
H. J. Page | J. Amer. chem. Soc. <u>79</u> , 5697 (1957) |
| 16 | B. Hegedüs | Helv. chim. Acta <u>31</u> , 737 (1948) |
| 17 | J. C. Sheehan, G. P. Hess | J. Amer. chem. Soc. <u>77</u> , 1067 (1955) |
| 18 | J. C. Sheehan, M. Goodman | J. Amer. chem. Soc. <u>78</u> , 1367 (1956) |
| 19 | J. A. MacLaren | Austral. J. Chem. <u>11</u> , 360 (1958) |
| 20 | Th. Wieland, H. Determann | Angew. Chem. <u>75</u> , 539 (1963) |
| 21 | J. Meienhofer | Chimia <u>16</u> , 385 (1962) |

- 22 H.Kappeler, R.Schwyzler Helv.chim.Acta 43,1453(1960)
- 23 E.A.Morozova,
S.M.Zhenodhrova J.allg.Chem.(russ.)31,45(1961)
- 24 V.du Vigneaud J.biol.Chem.118,391(1937)
F.Weygand Chem.Ber.90,634(1957)
- 25 B.Stein, F.L.Moore J.biol.Chem.211,893(1954)
- 26 R.Sarges Dissertation Frankfurt/M.1962
- 27 J.Fillman, N.Albertson J.Amer.chem.Soc.70,172(1948)
- 28 C.Mayer private Mitteilung
- 29 B.F.Erlanger, E.Brand J.Amer.chem.Soc.73,3508(1951)
- 30 H.Fischer, E.Sturm Liebigs Ann.Chem.461,268(1928)
H.Friedrich
- 31 Th.Wieland, O.Weiberg et al.Liebigs Ann.Chem.587,146(1954)
- 32 K.Freter Dissertation Frankfurt/M.1955
- 33 E.Groß Dissertation Frankfurt/M.1958
- 34 G.Schupfner Dissertation Frankfurt/M.1960
- 35 Th.Wieland, G.Pfleiderer Angew.Chemie 69,200(1957)
- 36 Th.Wieland, I.Sangl Liebigs Ann.Chem.671,160(1964)
- 37 R.H.Mazur J.biol.Chemistry 237,1619(1963)
- 38 O.Zipp private Mitteilung
- 39 H.Determann, O.Zipp Liebigs Ann.Chem.649,203(1961)
- 40 B.Iselin, R.Schwyzler Helv.chim.Acta 39,57(1956)
- 41 H.R.Snyder, C.W.Smith J.Amer.chem.Soc.66,351(1944)
- 42 L.Light and Co, Ltd. Chem.Abstracts 41,2747(1947)
H.J.F.Weiss
- 43 H.Faulstich weiterführende Versuche
- 44 R.H.Mazur J.biol.Chemistry 237,1619(1963)

Lebenslauf.

Heinz O. Faulstich, geb. 26. Februar 1934, als Sohn des Oberstadtsekretärs Wilhelm Faulstich und seiner Frau Karoline, geb. Frickel, zu Frankfurt am Main.

Schule und Studium:

Ostern 1940 - Ostern 1943 Günthersburg-Schule, Frankfurt am Main.

Ostern 1943 - Ostern 1944 Nationalpolitische Erziehungsanstalt Oranienstein.

Ostern 1944 - Ostern 1945 Hauptschule Langenselbold bei Hanau am Main.

Ostern 1945 - Herbst 1946 Volksschule Langenselbold bei Hanau am Main.

Herbst 1946 - Ostern 1955 Hohe Landesschule Hanau am Main.

Reifeprüfung im Mai 1955.

Sommer 1955 - Sommer 1958 Studium der Chemie an der Universität Frankfurt a.M.

Vorexamen im Mai 1958.

Winter 1958/59 - Sommer 1959 Universität München.

Winter 1959/60 - Winter 1962/63 wieder an der Universität Frankfurt am Main.

Hauptexamen im Juli 1960.

Diplomarbeit unter der Anleitung von Herrn Professor Dr. Theodor Wieland vom September 1960 - Juli 1961.

